



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Identificación molecular de Eubacterias halófilas  
moderadas productoras de exopolisacáridos aisladas  
en las salinas de Atacocha – Ayacucho**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

**AUTOR**

Yadira FERNÁNDEZ JERÍ

**ASESORES**

Amparo Iris ZAVALETA PESANTES

Acela Ines ARNAO SALAS

Lima, Perú

2007



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Fernández, Y. Inmovilización de lipasa producida por *Marinobacter* sp mediante adsorción interfacial en octadecilo-sepabeads [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2007.

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi sincero agradecimientos a la Dra. Amparo Zavaleta Pesantes, por haber guiado el desarrollo de este trabajo y llegar a la culminación del mismo, gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la confianza.

A la Mg. Inés Arnao Salas, por sus consejos y por compartir desinteresadamente sus conocimientos y experiencia.

A los pobladores de la comunidad de Atacocha, por todo el apoyo y ayuda prestada.

A mis queridos familiares por su apoyo constante y desinteresado.

A mis amigos de la Maestría, que gracias al equipo que formamos logramos compartir momentos de felicidad y tristezas, que me han entregado su apoyo siempre.

A todos los miembros del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica- UNMSM, con los que compartimos en el día a día las experiencias que nos dieron la investigación y la amistad.

*A Dios.*

*Por las bendiciones y los momentos difíciles que me han enseñado a conocer más su infinita bondad y amor.*

*A la memoria de mi padre.*

*Por el ejemplo de perseverancia y constancia y también por haber sido mi ángel guardián durante todos estos años.*

*A ti madre.*

*Por enseñarme a nadar contra la corriente, por la motivación constante por el amor que siempre me has brindado, a ti te debo lo que soy.*

*A mis Hermanos*

*Juan carlos, Elvira y Karla, Por ser el soporte de mi vida, por todos los momentos compartidos.*

## **CONTENIDO**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>LISTA DE ACRÓNIMOS.....</b>               | <b>7</b>  |
| <b>INDICE DE ANEXOS.....</b>                 | <b>8</b>  |
| <b>INDICE DE TABLAS.....</b>                 | <b>9</b>  |
| <b>INDICE DE FIGURAS.....</b>                | <b>10</b> |
| <b>RESUMEN.....</b>                          | <b>11</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                         | <b>12</b> |
| <b>I.-INTRODUCCIÓN.....</b>                  | <b>13</b> |
| <b>II.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>       | <b>15</b> |
| <b>III.-MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>        | <b>40</b> |
| <b>IV.-RESULTADOS.....</b>                   | <b>46</b> |
| <b>V.- DISCUSIÓN.....</b>                    | <b>62</b> |
| <b>VI.- CONCLUSIONES.....</b>                | <b>72</b> |
| <b>VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b> | <b>74</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>                           | <b>82</b> |

## LISTA DE ACRÓNIMOS

ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, Análisis de los perfiles de Restricción del ADN ribosómico Amplificado por PCR.

PCR: Polimerase Chain Reaction, Reacción en Cadena de la Polimerasa

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ADNr 16S: Genes Ribosómicos 16S

EPS: Exopolisacáridos

Medio de cultivo SW: Sea water médium, Médio de cultivo água de sales

Médio MY: Maltosa Yeast Medium, Médio maltosa levadura

PHB: Polihidroxibutiratos

dNTPs : desoxirribonucleótidos trifosfatos

NCBI: National Center for Biotechnology Information

RDP: Proyecto de genes Ribosómicos

## INDICE DE ANEXOS

**ANEXO 1.** Fig. N° 1. Ubicación Topográfica de las Minas Salinas de Atacocha - Ayacucho

**ANEXO 2.** Minas Salinas de Atacocha – Ayacucho.

**ANEXO 3.** Fig. N° 2. Muestras de sal sólida provenientes de las Salinas de Atacocha- Ayacucho.

**ANEXO 4.** Fig. N° 4. Pre-enriquecimiento de sales en caldo SW a diferentes concentraciones de NaCl.

**ANEXO 5.** Medio agua de sales SW. (Solución Stock 20%), Rodríguez Valera 1981.

**ANEXO 6.** Medio 593 (Medio MH al 10 %).

**ANEXO 7.** Medio 183 (MY-Halomonas).

**ANEXO 8.** Codificación por banda polimórfica del Análisis ARDRA- PCR según estados presencia (1) o ausencia (0)

**ANEXO 9.** Miembros de la familia *Halomonadaceae*, descritas al 2002 Fuentes e información de las secuencias de ADNr

**ANEXO 10.-**Características fenotípicas entre los miembros de la familia *Halomonadaceae*.



## INDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Exopolisacáridos microbianos de importancia comercial.....   | 30 |
| Tabla 2. Características fenotípicas de las bacterias halófilas moderadas productoras de EPS aisladas de las minas salinas de Atacocha Ayacucho.....            | 50 |
| Tabla 3. Tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos mediante ARDRA.....  | 54 |
| Tabla 4. Tamaño de las secuencias de los genes ribosómicos 16 S, de seis especies de bacterias halófilas moderadas productoras de EPS.....                      | 58 |
| Tabla 5. Distancias evolutivas y niveles de similitud de las secuencias parciales de ADNr 16S de 6 aislados de halófilos moderados productores de EPS.....      | 62 |
| Tabla 6. Características fenotípicas de las cepas ATA3, ATA4, ATA11, ATA17, ATA 20 y otras especies del género <i>Halomonas</i> y <i>Chromohalobacter</i> ..... | 72 |

## INDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Estructura química del dextrano.....   | 26 |
| Figura 2: Ciclos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....  | 37 |
| Figura 3: Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S.....  | 40 |
| Figura 4: Bacterias halófilas moderadas productoras de EPS en el medio MY suplementado con SW al 7%.....   | 48 |
| Figura 5: Genes ribosómicos 16S amplificados de bacterias halófilas moderadas productoras de EPS.....  | 52 |
| Figura 6: ADNr 16 S amplificado y cortado con enzimas de restricción separado en gel de agarosa al 5%, de bacterias halófilas productoras de EPS.....  | 54 |
| Figura 7: Dendograma de Similitud UPGMA, generado a partir de ARDRA de bacterias Halófilas moderadas productoras de EPS aisladas de las salinas de Atacocha -Ayacucho.....   | 56 |
| Figura 8: Árbol filogenético de los vecinos cercanos construido por comparación de las secuencias parciales del ADNr16S, entre los aislados ATA3, ATA4, ATA9, ATA11, ATA17 y ATA20, productoras de EPS aisladas de las minas salinas de Atacocha - Ayacucho y los miembros de la familia <i>Halomonodaceae</i> ..... | 60 |
| Figura 9: Árbol filogenético de Mínima evolución construido por comparación de las secuencias parciales del ADNr16S, entre los aislados ATA3, ATA4, ATA9, ATA17 y ATA20, productoras de EPS aisladas de las minas salinas de Atacocha - Ayacucho y los miembros de la familia <i>Halomonodaceae</i> .....            | 61 |
| Figura 9 Árbol filogenético de Máxima parciniomia construido por comparación de las secuencias parciales del ADNr 16S, entre los aislados ATA3, ATA4, ATA9, ATA11, ATA17 y ATA20, productoras de EPS aisladas de las minas salinas de Atacocha - Ayacucho y los miembros de la familia <i>Halomonodaceae</i> .....   | 62 |

## RESUMEN

Con el objetivo de aislar, seleccionar e identificar bacterias halófilas moderadas productoras de Exopolisacáridos (EPS), de interés biotecnológico procedentes de las minas salinas de Atacocha - Ayacucho, se sembraron salmueras al 5% en el medio agua de sales suplementado con extracto de levadura al 0.5%, se seleccionaron 20 aislados productores de exopolisacáridos en función a sus características fenotípicas en el medio sólido maltosa levadura suplementado con 7.5 % de NaCl. Pruebas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y nutricionales fueron utilizadas en la determinación de las características fenotípicas. El Análisis de Restricción del los genes ribosómicos 16S amplificados por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (ARDRA) se empleo para analizar la diversidad genética de los aislados productores de EPS. La secuenciación de los genes ribosómicos 16S de seis aislados productores de EPS permitió la identificación del género y especie. Todos los aislados fueron bacilos Gran negativos y crecieron en un rango óptimo de sal de 3 al 15%, a temperaturas entre 15 a 37 °C y pH de 5 a 9, con características fenotípicas diferentes. El análisis UPGMA de los perfiles generados por ARDRA demostró que existen 18 especies diferentes. Las secuencias de los genes ribosómicos 16S analizados para los aislados ATA3, ATA4, ATA-11, ATA9, ATA17 y ATA20 mostraron que ATA4, ATA-11, ATA9 y ATA17 pertenecen al género *Halomonas* y ATA3 y ATA20 pertenecen al género *Chromohalobacter*.

**PALABRAS CLAVE:** Eubacterias halófilas, Exopolisacáridos, ARDRA, genes ribosómicos 16S, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, diversidad bacteriana.

## ABSTRACT

In order to isolated, selected and identify moderate halophilic Exopolisacharide-producing bacteria, with interesting biotechnological properties from salines mines in Atacocha – Ayacucho, 5% brines were sowed in sea water plus 0.5% yeast extract, 20 isolated were selected us Exopolisacharide - produced since phenotypic features in agar Yeast Maltose (MY) plus NaCl 7.5%. Morphological, physiological, biochemical and nutritional tests were used to analyze phenotypic features. Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) was used to 16 ADNr in the study of the genetic diversity and the sequencing of the 16S rDNA from six isolates EPS - produced allowed identifying the streams. All of the isolates were Gram negative rods and grew at sea salt concentration with an optimum salt of 3 % to 15%, temperature of 15 to 37 °C and pH of 5 to 9, with different phenotypic characteristics. The UPGMA analysis of the generated profiles by ARDRA, indicate 18 different strains. 16S ribosomal gene sequence analyze of ATA3, ATA4, ATA-11, ATA9, ATA17 y ATA20 allow that their affiliation with the family *Halomonadaceae*, ATA4, ATA-11, ATA9 y ATA17 belong to the genus *Halomonas*; ATA3 y ATA20 belong to the genus *Chromohalobacter*.

**KEYWORDS:** Halophilic Eubacteria, Exopolisacharide, ARDRA, 16S ribosomal gene, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, genetic diversity.

## I.-INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el interés por la identificación de bacterias halófilas moderadas se ha incrementado debido a que estos microorganismos producen una gran variedad de metabolitos estables con interesantes aplicaciones biotecnológicas.

Los microorganismos halófilos habitan en un amplio rango de ambientes salinos, para competir exitosamente y resistir los efectos desnaturalizantes de la sal presentan estrategias que les permiten balancear la presión osmótica, ya sea manteniendo altas concentraciones intracelulares de sal o sintetizando solutos compatibles. Las bacterias halófilas moderadas, se caracterizan por crecer óptimamente a concentraciones de NaCl que van del 3 al 15 %, se distribuyen en ambientes salinos e hipersalinos y están constituidas por diferentes géneros con especies muy heterogéneas. En el ámbito industrial, poseen gran potencial biotecnológico y presentan ventajas adicionales como son: requerimientos nutricionales sencillos, fácil cultivo y manejo en el laboratorio bajo mínimas condiciones asépticas.

Los Exopolisacáridos (EPS) son bioespesantes que se añaden a una amplia variedad de productos donde actúan como viscosizantes, estabilizadores, emulsificantes o agentes gelificantes, siendo empleados en las industrias: alimentaria, farmacéutica, cosmética y en medicina. La gran mayoría de polisacáridos para uso industrial son de origen vegetal como: almidón, pectina, goma bean, goma guar, también se pueden obtener de algas marinas como carragenina y alginatos, sin embargo existen ciertas desventajas que limitan su uso comercial y esto se debe a que la cantidad y calidad dependen de la estación, región geográfica, algunas veces requieren modificaciones químicas en su estructura a fin de proporcionar las propiedades reológicas adecuadas; estas son algunas

razones para preferir actualmente el empleo de polisacáridos de origen microbiano, los mas empleados son: dextranos, xantanos, gelanos, pululanos, glucanos de levaduras y alginatos bacterianos .

Dentro del grupo de bacterias halófilas moderadas, se han descrito algunas especies del género *Halomonas* productoras de EPS con interesantes características reológicas, tales como: *Halomonas eurihalina*, *Halomonas maura*, *Halomonas ventosae* y *Halomonas anticariensis*. *H. maura*, es una de las especies más estudiada por producir el EPS conocido como Maurano, que presenta actividad viscozizante y emulgente, además su viscosidad se mantiene estable en un amplio rango de pH, tras procesos de congelación y descongelación y en presencia de sacarosa, sales y surfactantes, además este EPS presenta una alta capacidad de captación de plomo y otros cationes lo que permitirá su potencial empleo en procesos de biotratamiento. *H. eurihalina*, es otra especie que produce un polímero con excelente capacidad gelificante y emulsificante. Debido a la importancia biotecnológica de los EPS sumado a las características peculiares de las bacterias halófilas, se realizó la presente investigación con los siguientes objetivos:

- Aislar Eubacterias halófilas a partir de muestras de sal provenientes de las minas salinas de Atacocha - Ayacucho.
- Seleccionar Eubacterias halófilas moderadas productoras de exopolisacáridos en función a sus características fenotípicas.
- Identificar fenotípicamente a las Eubacterias halófilas moderadas productoras de EPS, mediante pruebas fisiológicas, bioquímicas y nutricionales.

- Identificar molecularmente Eubacterias halófilas moderadas productoras de EPS, mediante la técnica del ARDRA y el análisis filogenético de las secuencias de los genes ribosómicos 16S.

## **II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **I.1.- MICROORGANISMOS HALÓFILOS**

La palabra halófilo etimológicamente significa “amante de la sal”, ya que estos microorganismos crecen y sobreviven en ambientes salinos e hipersalinos, tales como lagos hipersalinos, agua de mar; pozos cristalizadores de sal, superficies de tierra salada, minas salinas, alimentos salados, etc. (1), por su amplia diversidad filogenética y metabólica estos se encuentran distribuidos en cada uno de los tres dominios de la vida: Archaeae, Eubacteria y Eucarya e incluyen a organismos: aeróbicos, anaeróbicos, autótrofos, heterótrofos, fermentadores, denitrificantes, reductores de sulfato y metanógenos (2).

Los microorganismos halófilos tienen la capacidad de equilibrar la presión osmótica de su medio ambiente, evitando la pérdida de agua celular por acumulación de sal o de solutos compatibles en su citoplasma, esta estrategia les permite resistir los efectos desnaturalizantes de altas concentraciones salinas (3), la acumulación de solutos compatibles es empleada por las bacterias halófilas moderadas, entre los principales solutos compatibles descritos se encuentran: glicina, betaina, glicerol, trealosa, glutamato, glutamina, ectoina y dihidroxiectoina, que pueden ser sintetizados o transportarlos directamente del medio ambiente (4).

#### **II.1.1.- Clasificación de los microorganismos halófilos**

La halofilia y sus grados han sido definidos y clasificados de muchas maneras (2,5), la mas aceptada es la clasificación realizada por Kushner y Kamekura, 1988 (6) basada en



la concentración de NaCl que permite el crecimiento óptimo de los microorganismos halófilos.

**Poco Halófilos o halófilos débiles**, típicamente representado por bacterias marinas, con crecimientos óptimos entre 0.2 y 0.5 M (1- 3%) de NaCl.

**Halófilos Moderados**, se encuentran los organismos que crecen óptimamente en medios que contienen entre 0.5 y 2.5 M (3 -15%) de NaCl.

**Halófilos Extremos**, se encuentran los organismos que crecen óptimamente en medios que contienen entre 2.5 y 5.0 M (5-30%) de NaCl.

### **II.1.2.-Eubacterias halófilas moderadas**

Las Eubacterias halófilas moderadas están representadas por un grupo heterogéneo de especies, que incluyen a diferentes géneros que se adaptan rápidamente a cambios externos en la concentración de sal y crecen óptimamente en un rango de NaCl entre 0.5 y 2.5M (3-15%) (6). Se han realizado estudios de su mecanismo de adaptación para proliferar en ambientes que poseen amplios rangos de salinidad así como acerca de su importancia biotecnológica (7,8).

Los primeros estudios que se hicieron en bacterias halófilas moderadas fueron reportados por Lefebre y Round, 1919 (9), quienes describieron a dos grupos de bacterias aisladas de muestras de pepinos fermentados, capaces de crecer entre 0 a 15 % y 5 a 25% de NaCl respectivamente; En 1935 Hof (10) realizó el cultivo de muestras de sales no refinadas en dos medios a diferentes concentraciones de NaCl, logró aislar colonias blancas que incluían a especies de *Bacillus* formadoras de endosporas que toleraban hasta 24% de NaCl. Posteriormente lograron identificar a la especie *Pseudomonas beijerincki*, aislada en un medio que contenía de 12 a 18 % de

NaCl, a partir de esta investigación se reconoció que la mayoría de grupos importantes de bacterias aisladas de ambientes salinos son capaces de desarrollarse en concentraciones por encima de 2.5M (15%) de sal y que además muchos grupos son fisiológicamente activos a concentraciones mas elevadas.

En 1980, seis especies de bacterias halófilas moderadas fueron incluidas en la lista de bacterias aprobadas (11), las cuales son: *Vibrio* (*Salinivibrio*) *costicola* (12), *Micrococcus* (*Nesterenkonia*) *halobius* (13), *Paracoccus* (*Halomonas*) *halodenitrificans* (14), *Flavobacterium* (*Halomonas*) *halmephilum* (15), *Planococcus* (*Marinococcus*) *halophilus* (16), y *Spirochaeta halophila*.

Rodriguez-Valera, 1986 (17) y Rodríguez-Valera y col, 1985 (18) realizaron estudios para aislar e identificar microorganismos halófilos en diferentes habitats salinos de España, para ello tomaron muestras de sal provenientes tanto de las costas Mediterránea de Alicante y Atlántica de Huelva, identificaron a los aislados dentro de los siguientes géneros: *Salinivibrio*, *Pseudomonas* – *Alteromonas* *Alcaligenes*, *Cinetobacter* y *Flavobacterium*. Posteriormente en función a los estudios filogenéticos todos estos géneros fueron reclasificados dentro de la familia *Halomonadaceae* (19)

El Gran Lago Salado de UTA-USA también alberga comunidades de bacterias halófilas, en este ambiente salino, Dobson y Franzmann. 1993 (20) y Fendrich, 1988 (21), reportaron a las siguientes especies: *Pseudomonas halophila*, *Halomonas variabilis* *Halobacillus litoralis* y *Halobacillus trueperi*. La presencia de halófilos también han sido reportadas en suelos salados, donde su composición difiere grandemente de los ambientes acuáticos, las especies dominantes es estos ambientes pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, los dos últimos reclasificados dentro de la familia *Halomonadaceae* (17).

Estudios microbiológicos realizados en lagos salados en la región de Vestfold Hills y en suelos salados en los valles secos de la Antártida, reportaron la presencia de bacterias halófilas moderadas pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Flavobacterium* y *Cytophaga* (22), la mayoría de ellos crecieron a concentraciones de NaCl entre 0.8 y 3.4 M (0.5 a 20%) y a temperaturas entre 0 y 5 °C .

Bacterias halófilas moderadas también se aislaron de muestras de bacalao seco que contenía alrededor de 19% de sal, también han sido aisladas en intestino de peces, soya fermentada, entre otros (23).

En las últimas décadas, los estudios relacionados a ambientes hipersalinos se extendieron a diferentes áreas geográficas, como resultado de ello se han aislado y caracterizado un gran número de especies de bacterias halófilas moderadas, tanto Gram negativas como Gram positivas, aeróbicos o anaeróbicos facultativos (24,25). Aunque algunas de las especies Gram negativas fueron consideradas en un principio como miembros de los géneros *Halomonas*, *Deleya*, *Volcaniella*, *Flavobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Halovibrio* o *Chromobacterium*, los datos fenotípicos y filogenéticos mostraron su relación cercana, incluyéndolos a todos como miembros de la familia *Halomonadaceae* (26, 20). Se han descrito más de 70 especies de bacterias halófilas moderadas (27).

### **II.1.3.- Aplicación biotecnológica de los microorganismos halófilos moderados**

Las potenciales aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos halófilos han sido descritos por Ventosa y Nieto, 1995 (8); Ventosa y col, 1998 (28); Margesin y Shinner, 2001 (29). Quienes describen a los halófilos moderados como microorganismos de valor biotecnológico, producen compuestos de interés industrial como: solutos

compatibles, enzimas, exopolisacáridos, además de presentar propiedades fisiológicas peculiares que facilitan su producción a escala industrial, como el crecimiento a elevadas concentraciones salinas que minimizan los riesgos de contaminación (28), requerimientos nutricionales simples, empleo de un amplio rango de compuestos de carbono como única fuente de carbono y energía (8). Además, Ventosa y col, 1998 (28) publicaron que la mayoría de herramientas genéticas empleadas en bacterias no halófilas se podrían emplear en estos microorganismos, lo cual facilitaría su manipulación genética.

Las principales aplicaciones biotecnológicas de las bacterias halófilas moderadas que han sido descritas son:

#### **II.1.3.1.-Producción de Enzimas**

Los halófilos moderados producen enzimas extracelulares e intracelulares, tales como amilasas, proteasas y nucleasas, que se pueden aplicar en el procesamiento de alimentos, lavandería, procesos biosintéticos y en tratamiento ambiental, en general pueden ser empleadas en diferentes procesos que involucren transformaciones enzimáticas (28, 29).

#### **I.II.3.2.-Producción de solutos compatibles**

La acumulación de solutos compatibles en el citoplasma es una estrategia empleada por un grupo heterogéneo de bacterias halófilas moderadas para poder resistir el estrés salino. Entre los solutos compatibles descritos se encuentran: ectoína, glicina, betaina, trealosa, glutamato (3), que presentan potenciales aplicaciones biotecnológicas como

estabilizadores osmóticos de enzimas, ácidos nucleicos, membranas y células enteras en condiciones de estrés como salinidad, desnaturalización térmica, desecación y congelación (29), también son producidos comercialmente como kits para biología molecular y estabilizadores de enzimas. La ectoína y la hidroxiectoína son producidos a gran escala a partir de cultivos de *Halomonas elongata* y *Marinococcus M5*. Estos compuestos son empleados en la formulación de cremas dérmicas para incrementar la actividad humectante (3, 28).

#### **II.1.3.3.-Producción de poli $\beta$ - hidroxibutirato (PHB)**

PHB es un polímero sintetizado intracelularmente y almacenado como reservorio de energía y carbono para las bacterias, en los últimos años se han convertido en los sustitutos preferidos de los plásticos petroquímicos, debido a su biodegradabilidad y su compatibilidad, recientemente se ha reportado la producción de PHB por *Halomonas boliviensis* una bacteria alcalino tolerante aislada en la Laguna Colorada de Bolivia (30).

#### **II.1.3.4.- Producción de Exopolisacáridos (EPS)**

El interés biotecnológico de estos compuestos reside básicamente en sus propiedades reológicas como agentes gelificantes, emulsificantes, espesantes, viscosizantes, que encuentran aplicaciones en las industrias de alimentos, farmacéutica, medicina, cosmética, textil y en los procesos de recuperación de petróleo (1, 8, 29).

#### **II.1.3.5.-Otras aplicaciones**

Otras aplicaciones que han sido descritas para los halófilos moderados son: producción de compuestos bioactivos y antimicrobianos, procesos de fermentación del pescado, contribuyendo con el sabor y aroma (31). Al respecto se han realizado estudios para aislar y caracterizar microorganismos presentes en los alimentos marinos tradicionales

en Corea, que permitió la descripción de una nueva especie de bacteria halófila moderada, identificada como *Halomonas alimentaria* (32).

## **II.2.- LA FAMILIA HALOMONADACEAE**

Franzmann y col, 1988 (19), propusieron a la familia *Halomonadaceae* como miembros de la  $\gamma$ -subclase de las *Proteobacteria*. Esta familia esta representada por varias especies halófilas y halotolerantes pertenecientes a diferentes géneros. Estos autores realizaron investigaciones para identificar la posición filogenética de la mayoría de especies de bacterias halófilas moderadas, aeróbicas y Gram-negativas que habían sido descritas hasta entonces como miembros de los géneros: *Halomonas*, *Deleya*, *Halovibrium* y que no podían ser diferenciadas en base a sus características fenotípicas y quimiotaxonómicas; el análisis de los genes ribosómicos 16S (ADNr 16S), permitió clasificar a la familia *Halomonadaceae* en tres géneros: *Halomonas*, *Zymobacter* y *Chromohalobacter*, estos dos últimos fueron descritos inicialmente con sus únicas especies *Zymobacter palmae* y *Chromohalobacter marismortui* respectivamente. Estudios posteriores incluyeron a las especies de *Cobetia marina* y *Carnimonas nigrificans* como miembros de esta familia.

El género *Halomonas* es el representante más grande de la familia *Halomonadaceae* con más de 30 especies descritas, seguido por el género *Chromohalobacter* actualmente representado por seis especies.

### **II.2.1.- El Género *Halomonas***

El género *Halomonas* fue descrito por Vreeland, 1980 (33) quien describió a los miembros de este género como bacilos Gram negativos que presentan tolerancia extrema al NaCl, catalasa positivos, aeróbicos aunque algunas cepas son capaces de crecer anaeróbicamente en presencia de nitrato (34), contienen ubiquinona 9 como la

principal quinona respiratoria (35), con un contenido G-C en el ADNr 16S en el rango de 52 a 68 mol %, se caracterizan por ser organismos fácilmente cultivables que pueden crecer en una amplia variedad de fuentes de carbono y que requieren únicamente del cation  $\text{Na}^+$  pero no del anion  $\text{Cl}^-$ , consecuentemente el sodio puede ser administrado como Bromuros, nitratos, sulfatos, acetatos o glutamato (5, 33). Las siguientes secuencias firmas en el ADNr 16S, han sido descritas para el género *Halomonas*, CCUAACUUCG, UUAUACCCG, AUAACUUG, CCCUCG, UCUCAG y UUAACG (35).

La primera especie del género *Halomonas* en ser descrita, fue *Halomonas elongata* ATCC 33173, aislada de un solar salado en la Isla de Bonaire en Nueva Antilla (36). Este organismo fue descrito como extremadamente versátil, capaz de crecer en un amplio rango de concentraciones salinas y en condiciones anaeróbicas usando nitrato como aceptor final de electrones, formando nitritos, también se ha reportado su crecimiento por fermentación de glucosa.

Otras cepas de *Halomonas* también han sido aisladas en Canadá, del Estuario Americano y Mar Muerto (38,39) en los nódulos Mangadiense en el Océano Pacífico (36) y en la Antártica (19).

En Bolivia fue identificada la especie *Halomonas boliviensis* sp. Nov, aislada de la Laguna colorada ubicada a 4,300 m.s.n.m, descrita como una especie versátil, capaz de utilizar diferentes carbohidratos como única fuente de energía (30).

Hasta el año 2002 se han publicado 19 especies de bacterias halófilas moderadas pertenecientes al género *Halomonas* y tres especies más para el género *Chromohalobacter* (Anexo N° 02).

Arahal y Col, 2002 (39), secuenciaron tanto los ADNr 16S y 23S de las 19 especies del género *Halomonas* descritos hasta entonces, encontrando que este género no es un grupo monofilético y que podría agruparse en tres sub-grupos. El grupo 1 formado por las especies de *Halomonas elongata*, *H. eurihalina*, *H. halmophila*, *H. halophila* y *H. salina*. El Grupo 2 formado por las especies: *H. aquamarina*, *H. meridiana*, *H. magadiensis*, *H. variabilis*, *H. venusta*, *H. halodurans* y *H. subglaciescola*. Las especies *H. pacifica*, *H. halodenitricans*, *H. cupida*, *H. desiderata*, *H. campisalis* y *H. pantelleriensis* no se encontraron dentro de ninguno de estos dos grupos y además forman grupos diversos.

### **II.2.2.- El Género *Chromohalobacter***

El género *Chromohalobacter* fue propuesto inicialmente con su única especie *C. marismontui* (40) dentro de la familia *Halomonadaceae*, esta especie fue aislada del mar muerto, descrita como bacteria halófila moderada por Elazari- volcani (15), poco después, otras especies fueron localizadas dentro de este género: *C. canadensis* y *C. israelensis* (41); *C. salexigens* (42), *C. Sarecensis* (43) *C. nigrandesensis* (44). Todas estas especies son bacterias halófilas moderadas, bastones Gram negativos, aeróbicas, móviles. Las especies del género *Chromohalobacter* forma un grupo monofilético dentro de la familia *Halomonadaceae*.

### **II.3.- EXOPOLISACÁRIDOS MICROBIANOS**

Los Exopolisacáridos microbianos son macromoléculas integradas por unidades monoméricas de azúcares, producidos por diversos microorganismos hacia el exterior de la célula microbiana.



Las bacterias que producen EPS han sido identificadas en una variedad de nichos ecológicos y el papel preciso de estos EPS depende del ambiente natural del microorganismo, muchas pero no todas las funciones adjudicadas a los EPS son de protección natural (45), contra la desecación y predación por protozoarios, también la presencia de una capa de polisacárido gelatinoso rodeando a la célula puede tener efectos significativos en las propiedades de difusión de nutrientes hacia y desde la célula. Las células rodeadas con una matriz de polímero pueden ser inaccesibles a la acción de agentes antibacterianos como antibióticos; en una variedad de ambientes la supervivencia depende de la habilidad de un microorganismo de adherirse a las superficies, la presencia de EPS en biopelículas adherentes en superficies inertes y biológicas ha sido reconocida desde hace bastante tiempo (46).

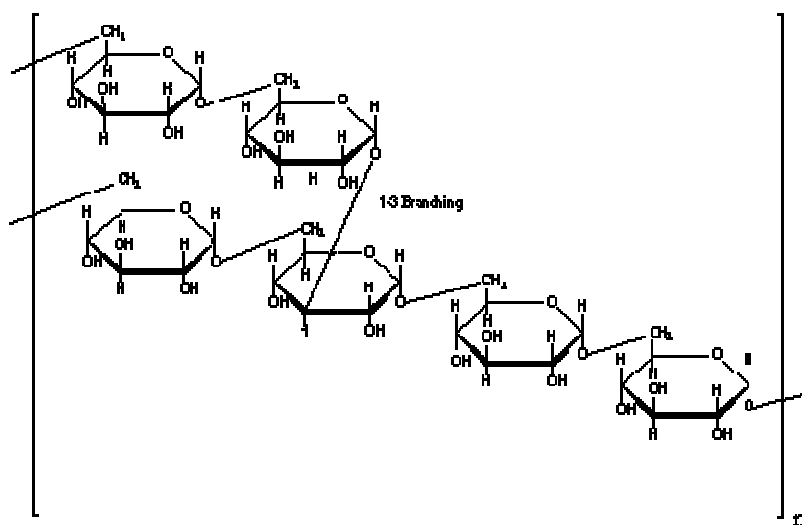
Muchas cepas de bacterias Gram positivas y negativas son capaces de sintetizar bajo ciertas condiciones polisacáridos extracelulares que son liberados al medio ambiente durante la fermentación, la cantidad de exopolisacárido producido depende de la cepa productora y de las condiciones de cultivo (47), además las características estructurales y reológicas también varían con la cepa productora tal como demuestran los análisis estructurales combinados con estudios reológicos que revelan que hay una considerable variación en los diferentes EPS (48) y esto debido a los monosacáridos que los conforman, los mas frecuentes son glucosa y galactosa, pero también se encuentran ramosa, fructosa, manosa, galactosamina, entre otros; son pocos los EPS microbianos que contienen 6-deoxi-azucres y cetosas, algunos EPS pueden contener ácido urónico tales como ácido D- glucorónico o ácido galactourónico, la presencia de ácido urónico hace que tales polisacáridos sean polianiónicos (49).

Los exopolisacáridos de acuerdo a su estructura se dividen en dos grupos principales, los homopolisacáridos y los heteropolisacáridos (50).

Los homopolisacáridos de naturaleza de glucanos neutros, de estructura lineal aunque se han descrito un número limitado de naturaleza aniónica por la presencia de grupos ácido.

La mayoría de los exopolisacáridos son heteropolisacáridos formados por dos o más azúcares diferentes y varios constituyentes ácido, gran parte de los heteropolisacáridos son polianiónicos y sus unidades repetitivas varían en tamaño desde disacáridos hasta octosacáridos, cada unidad repetida generalmente contiene un mol de ácido urónico, algunos son de cadenas cortas y muy pocos de estructura lineal (51).

El alginato producido tanto por *Acetobacter vinelandii* o *Pseudomonas aureaginosa*, es un buen ejemplo de heteropolisacáridos polianiónico, compuesto de ácidos D-manouránico y ácido L- glutámico además de grupos acetilos a nivel de los carbonos 2 y 3 (52).



**Fig. N° 01. Estructura química de Dextrano****II.3.1.- Biosíntesis de los polisacáridos**

Existen dos principales mecanismos para la síntesis de exopolisacáridos en microorganismos. El primero similar al de la síntesis de pared celular como proceso intracelular. El segundo, es la síntesis extracelular, este es menos frecuente encontrado solo en los productores de dextrano y levano (51, 52, 53).

El dextrano es un ejemplo de EPS sintetizado fuera de la pared bacteriana, el sustrato esencial para la síntesis de dextrano es la sacarosa aunque se ha reportado que otras fuentes de azúcares pueden emplearse para su síntesis (54).

La mayoría de los polisacáridos microbianos son sintetizados dentro de la célula. La síntesis se realiza por un complejo enzimático que usa a los nucleósidos monofosfato de monosacáridos como precursores. La función de los precursores es la de ser la fuente de energía para el ensamblaje de oligosacáridos. Adicionalmente existen precursores para la síntesis de monosacáridos en forma activada que juegan un rol importante en el anabolismo de carbohidratos (53).

**II.3.2.- Producción de EPS microbiano**

La capacidad de los microorganismos para producir EPS es regulada por genes y enzimas, en la mayoría de las bacterias la producción de EPS es controlada por un grupo de genes, el loci de estos genes puede estar contenido en un plásmido o en el ADN cromosómico o en ambos (52, 54, 55). Los genes específicos involucrados en la biosíntesis y transporte de los EPS han sido ampliamente estudiado, en la mayoría de los EPS de uso comercial, este loci se encuentra en ADN cromosomal (52).

### **II.3.3.- Aplicaciones de los polisacáridos microbianos**

Las aplicaciones industriales de los exopolisacáridos microbianos han sido descritas por varios autores (50, 52, 55). La importancia de su uso se basa en su capacidad tensioactiva, dispersante, floculante, biodegradabilidad específica; y sus propiedades adhesivas, captadoras y selectivas para iones, proteínas y lípidos. Las aplicaciones industriales pueden ser agrupadas en cuatro categorías principales como: industria alimentaria, farmacéutica, médica y medio ambiente, algunos de los EPS microbianos de importancia comercial se presentan en la tabla N° 1.

**II.3.3.1-Industria de Alimentos.** Los EPS son usados como texturizante, agentes estabilizadores y gelificantes. Sin embargo son pocos los EPS de origen microbiano que se emplean en alimentos, debido a las condiciones exigidas por la Food and Drug Administration (FDA), para ser aceptado como EPS de grado alimentario. La goma xantana fue uno de los primeros polisacáridos aprobado para ser empleado en la industria de alimentos donde se usa como agente ligante en alimentos para mascotas, agente emulsificante en aderezos de ensaladas, como estabilizador y agente espesante en productos lácteos (50,55, 56).

El segundo EPS microbiano aprobado por la FDA para uso alimentario fue el gelano producido por *Pseudomonas sp.* ATCC 31461 por fermentación en un medio rico en glucosa (56), esta goma presenta diferentes aplicaciones en la industria de alimentos, es empleado como texturizador y estabilizador en las confituras, glaceados y en heladería.

La producción de EPS por bacterias ácido lácticas ha sido reportado por varios investigadores (50, 51, 55, 56), estas bacterias son usadas en alimentos fermentados, donde actúan como cultivo iniciador, sin embargo la principal limitación de estos EPS se encuentran en los bajos rendimientos y en la inestabilidad en la producción del

polímero (57), industrialmente se utilizan los polisacáridos producidos por bacterias ácido lácticas para mejorar la consistencia y la textura del yogur, particularmente en Francia y Holanda donde la adición de estabilizadores obtenidos a partir de plantas o animales esta prohibida (55). También se han utilizado polisacáridos bacterianos como plastificantes y para la formación de películas protectoras de frutas y otros alimentos (50,56).

**Tabla N° 1. Exopolisacáridos Microbianos de Importancia Comercial**

| <b>Polímero</b>      | <b>Microorganismo</b>                  | <b>Aplicación</b>                                     | <b>Fuente</b>                                  |
|----------------------|--|---|--|
| Xantano              | <i>Xantomonas campestri</i>            | Industria de alimentos<br>Recuperación de<br>Petróleo | Roller & Dea,<br>1992<br>Sutherland,1992       |
| Gelano               | <i>Pseudomonas elodea</i>              | Industria de alimentos<br>y Farmacéutica              | Kang et al, 1982<br>Roller & Dea,<br>1992      |
| Dextrano             | <i>Leuconostoc<br/>mesenteroides</i>   | Clínica,<br>Separaciones                              | Sutherland,1990<br>Belder 1993                 |
| Celulosa             | <i>Acetobacter sp.p</i>                | Industria alimentaria                                 | Roller & Dea,<br>1992                          |
| Ácido<br>hialurónico | <i>Streptococcus sp.p</i>              | Medicina<br>Industria Farmacéutica<br>Veterinaria     | Jhons y Noor,<br>1991                          |
| Curdano              | <i>Alcaligenes sp.p</i>                | Industria alimentaria<br>( limitado a Japón)          | Morris 1988                                    |
| Emulsano             | <i>Acinetobacter<br/>calcoaceticus</i> | Recuperación del<br>Petróleo                          | Sutherland,1990<br>Roller & Dea,<br>1992       |
| Ac. Algínico         | <i>Azotobacter vinelandii</i>          | Industrial  | Morris 1988<br>Jhons y Noor,<br>1991           |
| Scleroglucano        | <i>Sclerotium glucanicum</i>           | Industrial<br>Recuperación de<br>Petróleo             | Sutherland,1990                                |
| Succinoglicano       | <i>Agrobacterium<br/>radiobacter</i>   | Industrial<br>Recuperación de<br>Petróleo             | Sutherland,1992                                |
| Pullulano            | <i>Aureobasidium pullulans</i>         | Industria Bioquímica                                  | Jhons y Noor,<br>1991<br>Roller & Dea,<br>1992 |

### **II.3.3.2- Aplicación Industrial**

Los polisacáridos microbianos podrían competir con otros polímeros orgánicos en aplicaciones industriales con la ventaja de que ellos son biodegradables y no tóxicos (49).

Las industrias que emplean cada vez más EPS microbianos son la industria petrolera, enzimática y textil.

En la industria del petróleo se emplean EPS para la recuperación del petróleo, siendo la goma xantana y el emulsano los mas usados en este campo (57) por sus características peculiares ya que ellos producen soluciones de elevada viscosidad a concentraciones bajas, además de no ser adversamente afectados por la salinidad y son estables a elevadas temperaturas (51, 52, 54, 58).

Los alginatos bacterianos son empleados como espesantes en la producción de tintas, siendo los más apropiados por ser compatibles con las tinturas empleadas en la industria textil (56).

Los EPS microbianos también son usados en agricultura y horticultura como texturizantes de tierra y protectores para semillas, como vehículos para inoculantes y en la administración controlada de nutrientes al cultivo (53).

### **II.3.3.3- Aplicación Médica y Veterinaria**

Son muchos los polisacáridos microbianos que tienen importancia médica y farmacéutica, el dextrano es uno de los EPS más antiguos en el ámbito médico (51,53) comercialmente es producido por *Leuconostoc mesenteroides* por fermentación en un

medio rico en sacarosa, su producción anual excede las 500 toneladas métricas destinadas a la aplicación médica (58), es usado como sustituto de plasma sanguíneo y comercializado en solución salina al 6% (59).

El ácido hialurónico es un EPS microbiano de importancia médica y veterinaria, tradicionalmente era extraído de tejido conectivo, actualmente es producido por fermentación microbiana, empleando *Streptococcus remains* y *Pseudomonas aureaginosa* (58,59). El ácido hialurónico se usa en las áreas de oftalmología, cirugía ortopedia y en la cicatrización de heridas provenientes de articulaciones inflamadas. También se ha reportado su uso en la industria farmacéutica, en las lociones de rejuvenecimiento facial y en pomadas cicatrizantes (59).

El alginato bacteriano y la celulosa también son EPS microbianos de importancia médica, los alginatos de calcio son fibras usadas en el tratamiento de cicatrización, la celulosa es empleada como vendas para heridas ya que forman una especie de piel artificial en quemaduras de segundo y tercer grado (58).

#### **II.3.3.4- Aplicaciones en el Manejo del Medio Ambiente**

Los EPS microbianos, como la mayoría de los biopolímeros, también han sido reportados por ser capaces de remover metales pesados en ambientes contaminados, la bacteria *Zoogloea ramigera* han sido ampliamente estudiada (60).

### **II.4.- BACTERIAS HALÓFILAS PRODUCTORAS DE EXOPOLISACÁRIDOS**

Son numerosas las bacterias que producen EPS, ya que estos les proporcionan una serie de ventajas como son la adhesión microbiana a superficies y el aumento de la captación de nutrientes (50, 51), Entre los microorganismos halófilos la producción de EPS ha sido descrita para algunas especies de bacterias halófilas moderadas, tal como lo



demuestran las investigaciones realizadas por Quesada y col, 1993 (61), que fue uno de los primeros estudios de EPS en bacterias halófilas moderadas, los investigadores describieron el EPS V27 producido *Halomonas eurihalina* F2-7, un EPS de carácter ácido, a demás los investigadores demostraron que la composición química y producción dependen de los nutrientes (62, 63, 64,65).

Estudios realizados por Béjar y col, 1998 (63), permitió la caracterización de los exopolisacáridos producidos por 19 cepas de *Halomonas eurihalina*, determinaron la composición óptima del medio para la producción de EPS, así mismo estudiaron las diferentes propiedades reológicas de los polisacáridos producidos por las diferentes cepas, los polisacáridos estudiados demostraron ser de naturaleza aniónica, con alto contenido de sulfatos. Además de las características reológicas de estos EPS, Pérez – Fernández y col, 2000 (66), demostraron actividad inmunomodulatoria del EPS producido por *H. eurihalina* V2-7 en la proliferación inespecífica de linfocitos T humanos extraídos de sangre periférica en respuesta a la presencia del estímulo antigénico de un anticuerpo monoclonal anti-CD3.

Martínez-Checa y col, 2002 (65) estudiaron en detalle el exopolisacárido secretado por *H. eurihalina* H28, que demostró excelente capacidad emulsificante de petróleo crudo en comparación con otros surfactantes estudiados (Tween 20 y 80), además sugirieron la posibilidad de usar este polímero en la industria del petróleo por presentar alta viscosidad a concentraciones diluidas y a elevadas temperaturas, excelente pseudo plasticidad y resistencia a altas concentraciones salinas.

El maurano es otro EPS descrito por Arias y col, 2003 (67), producido por *Halomonas maura* S-30 (68), aislada de los Salares de Asilah en Marruecos, se caracteriza por sus propiedades emulgentes y viscosizantes.

En las últimas décadas, la comunidad científica ha centrado su interés por el aislamiento e identificación de microorganismos halófilos productores de exopolisacáridos (2, 28,29) debido a que estos biopolímeros poseen características ventajosas no encontradas en muchos otros polisacáridos comúnmente usados, que son producidos por algas marinas y plantas.

Las bacterias halófilas moderadas aún no han sido usadas extensamente en procesos biotecnológicos, no obstante son remarcadas las aplicaciones industriales de estos halófilos y generan una promesa para el futuro por la producción de exopolisacáridos de carácter polianiónico (29).

## **II.5.- IDENTIFICACIÓN BACTERIANA**

La identificación bacteriana es un proceso por el cual se determina a que especie pertenece una determinada cepa bacteriana, mediante la comparación de una serie de características que pueden ser puestas en evidencia en el laboratorio y que han sido estudiadas para la gran mayoría de las especies importantes.

La determinación de la diversidad genética dentro de las poblaciones microbianas es clave para establecer una taxonomía estable que permita idear protocolos de identificación; a fin de que los nuevos aislados puedan ser rápidamente caracterizados. Los métodos serológicos (ELISA), bioquímicos basados en la utilización de diferentes sustratos (BIOLOG, API), los análisis de ácidos grasos (FAME) o los análisis de isoenzimas (LEE ) fueron y siguen siendo los métodos más empleados en identificación bacteriana. El desarrollo de la biología molecular ha causado un cambio significativo en el tipo de herramienta utilizada, permitiendo una caracterización y clasificación mucho más rápida y fiable. Los protocolos que analizan ácidos nucleicos

reducen el tiempo utilizado, producen resultados más estables y repetitivos, con frecuencia reflejan más fielmente las relaciones filogenéticas y son útiles para ordenar las cepas en grupos coherentes. La determinación de género y especie microbiana está basada en los métodos de hibridación ADN-ADN y en el análisis de la secuencia del ADNr 16S y la comparación con sus semejantes más cercanos filogenéticamente (69).

### **II.5.1- Técnicas moleculares**

Se basan en analizar la complejidad y variabilidad del contenido genético de los organismos. Los avances en biología molecular han permitido desarrollar técnicas usadas como herramientas de investigación en muchas disciplinas, en base a estas técnicas, en los últimos años se está revisando toda la sistemática de los microorganismos propuesta clásicamente a partir de caracteres morfológicos, estableciendo a través del análisis de secuencias de ADN, árboles filogenéticos mucho más precisos.

Entre las técnicas basadas en el ADN, se tienen: la digestión del ADN total mediante endonucleasas que cortan de forma frecuente (REA) o infrecuente (PFGE, FIGE), los perfiles plasmídicos, análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y el análisis de los genes ADNr. Estas técnicas son habitualmente utilizadas para obtener información en la clasificación dentro de los niveles de especie, subespecie y cepa.

Muchos de los métodos moleculares para la clasificación e identificación de cepas están basados en la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleándose dos tipos de aproximaciones: La primera implica la amplificación de uno o pocos fragmentos de ADN específicos, tales como partes del operón de ADNr,

seguido de un análisis de restricción (ARDRA). La segunda técnica hace uso de oligonucleótidos que actúan a modo de cebadores inespecíficos para la amplificación de numerosos fragmentos diferentes de ADN genómico (RAPD-PCR), generando patrones de bandas o “huella dactilar” específica para cada grupo de microorganismos.

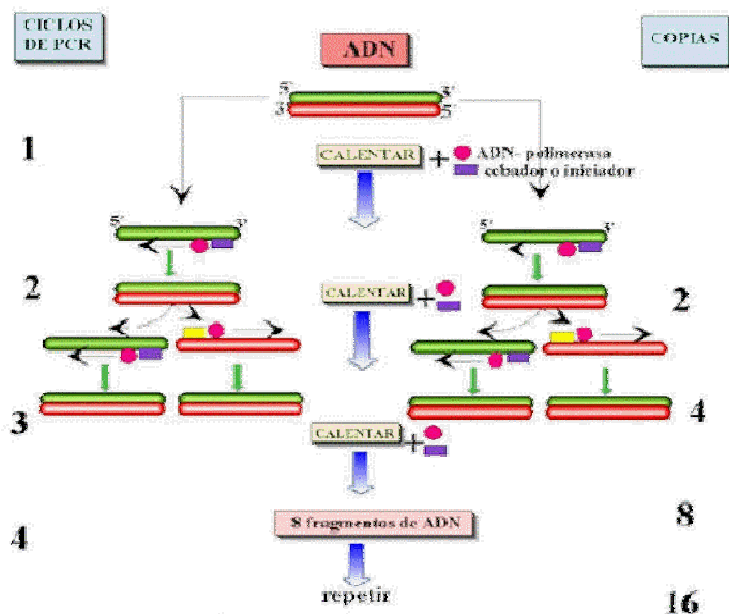
La aplicación de las técnicas moleculares a la taxonomía como el uso de sondas moleculares y de PCR aportó datos muy interesantes sobre la diversidad microbiana en ambientes hipersalinos (39,42, 69, 70,71).

#### **II.5.1.1- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La PCR es una técnica molecular, que permite la amplificación *in Vitro* de una región específica de ADN como resultado se obtienen millones de copias de una secuencia determinada del genoma de un organismo. Esta técnica toma como fundamento la replicación *in vivo* del ADN, la mezcla de reacción contiene: ADN molde, cebadores específicos, desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), la enzima ADN polimerasa, buffer de reacción que contiene iones  $Mg^{2+}$ , cationes monovalentes y cosolventes que ayudan a la estabilidad de la enzima. La PCR es un proceso automatizado que se lleva a cabo en un termociclador donde cada ciclo consta de tres etapas:

|         |                   |
|---------|-------------------|
| Etapa 1 | Desnaturalización |
| Etapa 2 | Hibridación       |
| Etapa 3 | Polimerización    |

La técnica de la PCR ha demostrado ser excepcionalmente valiosa en numerosas áreas de biología molecular, medicina y biotecnología. Puede utilizarse para amplificar cantidades muy pequeñas de ADN específico y proporcionar material suficiente para secuenciar o clonar el fragmento con precisión mediante técnicas estándares Prescott, 2004.



**Fig.Nº2. Ciclos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.**

**II.5.1.2- Análisis de los perfiles de Restricción del ADN ribosómico Amplificado por PCR (ARDRA).** Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, es una técnica molecular que combina la amplificación por PCR de los genes ribosómicos 5S, 23S, 16S ó 18S y la digestión del producto amplificado con enzimas de restricción, que son endonucleasas que reconocen secuencias específicas en la doble cadena del ADN generando un patrón característico de fragmentos en cantidades equimolares permitiendo detectar los polimorfismos en la secuencia de ADN, en este caso las variantes genóticas se detectan como variaciones en el tamaño de fragmentos de restricción. ARDRA puede ser utilizada como una técnica eficiente y rápida para evaluar las diferencias entre grupos filogenéticos.

### **I.5.1.3.- Secuenciación de los genes ribosómicos**

La secuenciación de ácidos nucleicos es un método nuevo dentro de los estudios de sistemática, sin embargo ha demostrado ser uno de los más útiles para inferir la historia filogenética de los organismos, a partir de la comparación de secuencias del ADNr16S se puede establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas (72), hecho que ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias .

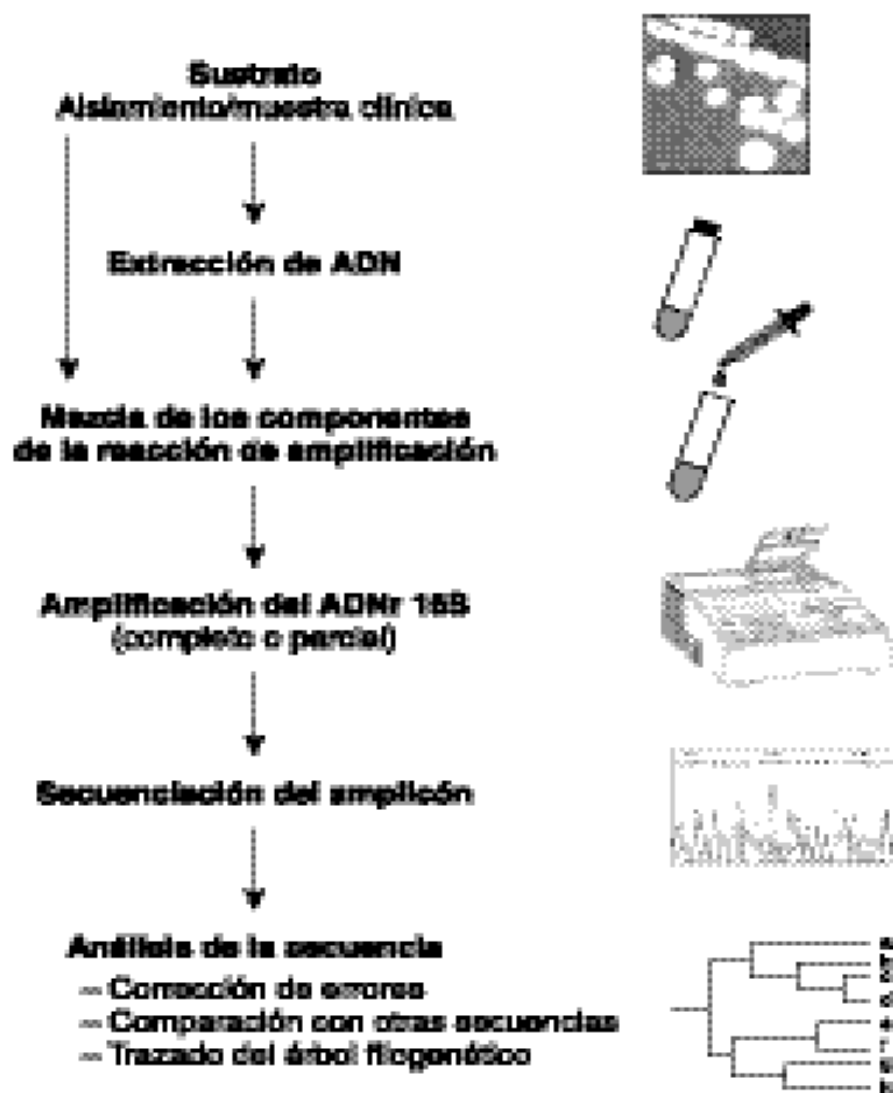
Los ARN ribosómicos forman parte integral de la maquinaria de síntesis proteica básica de toda célula viva, sus tipos están universalmente distribuidos en todos los seres vivos, con alguna diferencia menor entre los reinos, su función es constante en toda la escala biológica y los tipos existentes presentan una variación en la longitud de la molécula adecuada para medir cualquier distancia filogenética, razones por lo que son considerados como los principales cronómetros moleculares. El ADN ribosomal bacteriano esta conformado por una serie repetitiva (tandem) de tres regiones génicas 16S, 23S y 5S y de sus espaciadores intergénicos (ITS o IGS). En procariotas los genes ribosómicos están organizados en operones que permite la transcripción de cantidades equimolares de cada ARNr, son transcritos como una única molécula de ARN y posteriormente son separados por ribonucleasas en sus componentes, el número de operones por genoma bacteriano varía desde 1 a 15 copias dependiendo de la especie.

El ARN ribosómico 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese (72) a principios de la década de 1970, además el análisis de la secuencia de los ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos reveló un hecho

adicional de gran importancia práctica: la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma, se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos o en la mayor parte de los miembros de un determinado grupo filogenético y nunca o sólo raramente están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo.

Los productos de las secuencias de los genes ADNr16S obtenidos luego de la secuenciación, pueden ser comparados con otras secuencias ADNr16S que están depositadas en bases de datos de acceso público como es el “Gene Bank”, mantenidas en el “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), además de otras bases de datos que se encuentran disponibles en internet, los software de estos sitios son usados para las comparaciones de la secuencia investigada con todas las secuencias disponibles en las base de datos.

**Figura N°3.** Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S.





### **III.- MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **III.1.- Recolección de las Muestras**

Se recolectaron muestras de sal provenientes de las minas salinas de Atacocha ubicado a 41 Km al Nor este de la ciudad de Ayacucho a 3200 m.s.n.m con latitud 13° 03' sur; Longitud 74° 23' Oeste (Anexo 1) en el mes de octubre del 2003. Las muestras se tomaron en recipientes estériles y se transportaron en frío para ser cultivadas dentro de las 48 horas.

#### **III.2.- Aislamiento y selección de halófilos Productores de EPS**

Las muestras de sal fueron sembradas en el medio agua de sales (SW) descrito por Rodríguez Valera, 1981 (73) a concentraciones de NaCl de 5, 10, 15 y 20%, el pH se ajustó a 7.2 y los cultivos se incubaron a 37 °C por 72 horas. Después de este periodo de preenriquecimiento, se sembraron 50 µl. de cada uno de los cultivos en medio sólido SW con 2% de Bacto agar a las mismas concentraciones de NaCl y condiciones de cultivo. Las colonias que presentaron diferentes características fenotípicas de forma, tamaño, color y apariencia de la colonia, se seleccionaron y purificaron por tres pasajes sucesivos.

Se uso el medio sólido MY (63) modificado que contenía 3 g de extracto de levadura y 3 g de maltosa suplementada con agua de sales al 7.5% para la selección de las colonias productoras de EPS.

### **III. 3.-Características Fenotípicas**

#### **III. 3.1. Características Morfológicas**

La tinción Gram y la prueba de motilidad se determinó en cultivos de 24 horas, las características culturales de las colonias fueron observadas en medio sólido SW, después de 72 horas de incubación a 37 ° C.

#### **III.3.2.- Pruebas Fisiológicas**

La tolerancia a diferentes concentraciones de sal se determinó en el medio líquido SW suplementado con extracto de levadura al 0.5% y concentraciones salinas de: 0.0, 0.5, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 22.0, 24.0, 26.0 y 30.0 %.

El pH óptimo se determinó en el medio sólido MH según el procedimiento de Mata y col, 2002 (74), el pH se ajustó con HCl o NaOH 1M.

La temperatura óptima se determinó empelando el medio sólido MH, incubando los aislados a temperaturas de: 4, 20, 37 y 45 °C.

#### **III.3.3.- Pruebas bioquímicas**

La actividad catalasa, se determinó añadiendo peróxido de hidrógeno al 3% a cada aislado crecido durante 24 horas, se reportó como positiva la formación de burbujas.

La actividad oxidasa, fue determinada usando Oxidasa Droper del Laboratorio BD según las especificaciones del fabricante.

El consumo de glucosa tanto por oxidación y fermentación fue estudiada en el medio basal Oxido- Fermentación, OF (DIFCO) suplementado con NaCl al 7.5% y glucosa al 1%.

La producción de H<sub>2</sub>S y de gas fue probada en el medio TSI suplementada con NaCl al 7.5%.

La hidrólisis de gelatina se determinó usando el agar gelatina nutritiva de DIFCO suplementada con NaCl al 7.5%, los cultivos se dejaron crecer por 24 horas a 37 °C y la hidrólisis fue comprobada por licuefacción después de someter los cultivos a 4 °C por 15 minutos.

Para la hidrólisis del almidón se empleo el medio agar almidón de DIFCO, suplementada con NaCl al 7.5%, los cultivos se dejaron crecer por 48 horas a 37 °C y la hidrólisis se comprobó después de este tiempo añadiendo una gota de lugol sobre cada una de las colonias que crecieron. Para la hidrólisis del twenn 20 se empleó el medio MH al 7.5% de NaCl al cual se añadió 1% de Tween 20 estéril, los cultivos se dejaron crecer por 48 horas, la presencia de un halo alrededor de la colonia indicaba hidrólisis de tween.

El crecimiento en agar Mc Conkey se ensayo en este medio suplementado con NaCl al 7.5%.

### **III.3.4.- Pruebas Nutricionales**

Se realizó esta prueba para determinar el consumo de carbohidratos, para lo cual se empleó el medio SW al 7.5% de sales y se añadió cada uno de los carbohidratos a

ensayar a la concentración de 0.2% (74) los carbohidratos empleados fueron: glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, galactosa y manosa.

### **III.4.- Identificación molecular de las Bacterias Halófilas productoras de EPS**

#### **III.4.1.- Extracción del ADN genómico**

Se extrajo el ADN genómico según la metodología descrita por Zavaleta y col, 1996 (75) con algunas modificaciones. Se tomaron 2ml de cultivo bacteriano en fase exponencial, aproximadamente 24 horas, se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos, el pellet se lavó dos veces con buffer salino y se resuspendió en 500 µl de STE 1X, se añadió dodecil sulfato de sodio y proteinasa K a una concentración final de 20 µg/ ml, se incubó a 55 °C durante una hora. El ADN se purificó mediante volúmenes iguales de fenol cloroformo-isoamilalcohol, en seguida se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto y finalmente se resuspendió en solución Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8 (tampon TE) se verificó la extracción y pureza por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### **III.4.2.- Análisis de restricción de ADNr amplificado por PCR (ARDRA)**

Se amplificaron los genes ribosómicos 16S usando cebadores universales para Eubacterias. 50 Ng de ADN genómico se amplificó mediante la técnica de PCR en un volumen final de 25µl, la mezcla de la reacción contenía: KCl 50 mM, Tris / HCl ( pH 9 a 25°C) 10 mM, triton X-100 0,1 % (v/v) , MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, 200 µM de cada desoxirribonucleótido ( dATP, dCTP, dGTP,dTTP), 50 pmoles de cada cebador y de *Taq* ADN polimerasa (invitrogen) 1.5 U. Las condiciones de cada ciclo de reacción se programaron en un termociclador (Perkin Elmer 2400) de la siguiente manera:

Desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos.

35 ciclos con las siguientes etapas:

Desnaturalización                      94 °C   por 45 segundos;

Hibridación                              55 °C   por 1 minuto

Polimerización                            72 °C   durante 2 minuto

Extensión final de 7 minutos a 72 °C

Los productos resultantes de la amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1X. Los productos amplificados se digirieron con 5U de las enzimas de restricción *Cfo I*, *Hae III*, *Rsa I*, *Hinf I* (Invitrogen), según las especificaciones del fabricante. Las mezclas se incubaron a 37 °C por 12 horas y los productos de la digestión se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 3%, empleando buffer TBE 0.5 X, se corrió en paralelo a las muestras 10 µL del marcador de peso molecular Hyperlader II GIBCO BRL de 50 – 2000 pb, la electroforesis se realizó a 80 V durante 4 horas y finalmente las bandas de ADN se visualizaron bajo luz ultravioleta.

#### **III.4.3.- Análisis de geles y dendogramas**

Los patrones de bandas obtenidos al separar los fragmentos de ADN por electroforesis en gel de agarosa de los productos de restricción de los genes ribosómicos 16S amplificados por PCR, se codificaron por banda polimórfica según presencia (1) o ausencia (0) (anexo 8), los cuales se registraron por inspección en una matriz de datos, en el programa NTEDIT del paquete estadístico NTSYS, pc ver. 2,1 (Applied Biostatistics Inc, 2001). Los niveles de similitud entre los patrones se calcularon mediante el coeficiente de similitud Dice (*SD*) y sobre la matriz obtenida se aplicó el análisis de agrupamiento o Cluster Análisis, empleando el método de agrupamiento UPGMA ,mediante la opción SAHN CLUSTERING del paquete NTSYS pc y con la opción TREE DISPLAY, se visualizaron los agrupamientos en forma de dendograma.

#### III.4.4.- Secuenciación de los genes ribosómicos 16S

Los genes ribosómicos 16S amplificados por PCR fueron purificados por columnas de intercambio iónico (Cyclo – pure –PCR), se resuspendió en 4µL de agua estéril, se cuantificó la concentración de ADN, La secuenciación del ADN de ambas bandas se realizó por el método de terminación de cadena Dideoxy empleando para ello *primers* universales en la posición:

8-27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

1492R : 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

La secuenciación se llevo a cabo en el analizador de ADN ABI prism 3100, del Instituto de Medicina Tropical “Alexander Von Humbolt” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

#### III.4.5. Análisis filogenético

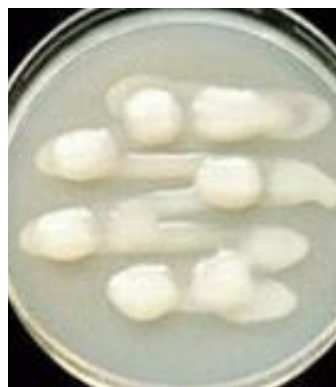
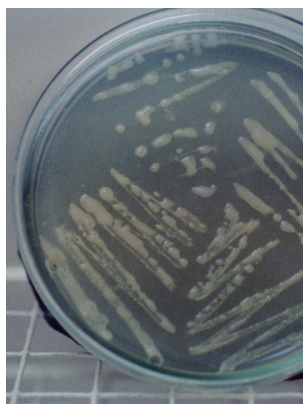
Las secuencias de los ADNr 16S obtenidas fueron ensambladas usando el programa bioinformático Chromas Pro version 1.33 (Technelysium) y comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos del Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y Proyecto de genes Ribosómicos, RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>), usando el programa BLASTn. El alineamiento de las secuencias se realizó mediante el programa CLUSTAL W (76) que se encuentra en la base de datos EMBL ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)), empleando solo secuencias de las cepas tipo cuyos nombres han sido debidamente validados y publicados como miembros de los géneros *Halomonas* y *Chromohalobacter*, las especies de *Zymobacter palmae* y *Carnimonas nigrificans* fueron usadas como grupos externos. En el análisis filogenéticos se utilizó el programa bioinformático MEGA versión 3.1 (Molecular

Evolutionary Genetics Análisis). Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando los métodos de los vecinos cercanos (77), mínima evolución y el de máxima parsimonia (78), utilizando el modelo de Jukes& Cantor, 1969 (79). La estabilidad de las relaciones filogenéticas fueron apoyadas por el análisis bootstrap de 1000 repeticiones.

## IV.- RESULTADOS

### IV.1.- Aislamiento y selección de bacterias halófilas productoras de EPS

Se aislaron un total de 40 colonias de bacterias halófilas que presentaron características fenotípicas diferentes en el medio agua de sales, después de tres pasajes sucesivos para garantizar la pureza, estos aislados fueron sembrados en el medio sólido MY suplementado con agua de sales al 7.5%, para seleccionar las colonias productoras de EPS, después de 72 horas de crecimiento a 37 °C se seleccionaron 20 aislados que formaron colonias grandes y gomosas (Fig. N°4), los mismos aislados se sembraron en medio MY líquido sin agitación, donde formaron una capa emulgente, comprobando la producción de EPS.



**Figura N°4. Bacterias halófilas moderadas productoras de EPS en el medio MY suplementado con agua de sales al 7.5 %.**

#### **IV.2.- Características fenotípicas de las bacterias halófilas productoras de EPS**

A los 20 aislados seleccionados como productores de EPS se les determinó sus características: fisiológicas, bioquímicas y nutricionales, según las recomendaciones de Mata y col 2002 (74). Todos los ensayos se llevaron a cabo a la concentración de 7.5% de NaCl, descrito para el crecimiento óptimo de un amplio rango de bacterias halófilas moderadas, principalmente para las especies del género *Halomonas* (6).

Las características fenotípicas de cada uno de los 20 aislados se presentan en la tabla N° 02. Los aislados seleccionados fueron aeróbicos, Gram negativos, de forma abastionada, crecieron en un rango óptimo de sal entre 5 y 15%, toleraron hasta el 24% de salinidad, pH entre 5 y 9 y temperaturas entre 20 y 45 °C.

Los 20 aislados productores de EPS no hidrolizaron tween 20, tampoco crecieron en agar Mc conkey ni produjeron H<sub>2</sub>S.



Los aislados ATA8 y ATA10, hidrolizaron almidón, la prueba de oxidasa solo resultó positiva para el aislado ATA8.

El 90% y 80% de los aislados usaron la maltosa y glucosa como única fuente de carbono respectivamente, solo un 5% hidrolizaron fructosa.

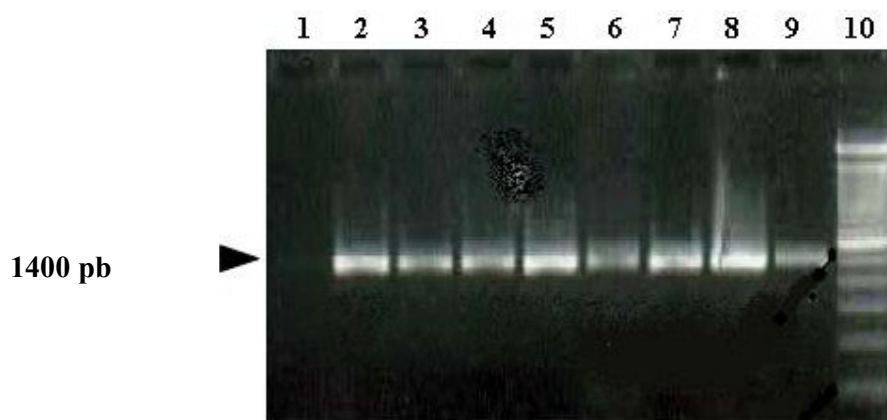
**Tabla N° 2.** Características fenotípicas de las bacterias halófilas moderadas productoras de Exopolisacáridos aisladas de las minas salinas de Atacocha – Ayacucho.

| Características                | 1          | 2      | 3      | 4      | 5       | 6      | 7      | 8      | 9      | 10      | 11     | 12     | 13     | 14     | 15     | 16     | 17     | 18     | 19     | 20     |
|--------------------------------|------------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Pigmentación de la colonia     | anaranjado | Crema  | blanco | melón  | crema   | crema  | Blanco | blanco | melón  | blanco  | crema  | crema  | blanco |        | crema  | crema  |        | crema  | crema  | crema  |
| Motilidad                      | -          | -      | +      | -      | -       | -      | -      | +      | -      | -       | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| Producción de ácido de Glucosa | -          | +      | +      | -      | +       | +      | +      | +      | +      | -       | +      | +      | +      | -      | +      | +      | +      | +      | +      | +      |
| Oxidasa                        | -          | -      | -      | -      | -       | -      | -      | +      | -      | -       | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| Catalasa                       | +          | +      | +      | +      | +       | +      | -      | -      | +      | +       | -      | -      | +      | -      | -      | +      | +      | +      | +      | +      |
| Rango de Tolerancia de Sal (%) | 5,0-22     | 3,0-25 | 5,0-24 | 5,0-20 | 10,0-24 | 5,0-26 | 0,5-22 | 0,5-25 | 0,5-24 | 5,0-22  | 2,0-24 | 2,0-24 | 1,5-24 | 1,5-24 | 0,5-24 | 1,0-24 | 5,0-24 | 1,5-24 | 2,5-26 | 2,5-28 |
| Óptimo de Sal                  | 5,0-15     | 3,0-10 | 3,0-10 | 5,0-10 | 10,0-15 | 5,0-10 | 3,0-10 | 3,0-15 | 3,0-10 | 10,0-15 | 5,0-15 | 5,0-15 | 2,5-10 | 3,0-10 | 5,0-10 | 2,5-10 | 5,0-15 | 3,0-10 | 5,0-15 | 5,0-10 |
| Rango de Temperatura (°C)      | 4,0-45     | 20-45  | 20-45  | 20-45  | 20-45   | 20-45  | 20-45  | 20-45  | 20-45  | 20-25   | 20-45  | 20-45  | 20-45  | 20-37  | 20-37  | 20-37  | 20-45  | 4,0-45 | 45     | 20-37  |
| Aerobio                        | -          | +      | +      | -      | -       | +      | +      | +      | -      | +       | +      | +      | -      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      |
| Anaerobio                      | +          | +      | -      | +      | +       | +      | +      | +      | +      | -       | -      | -      | -      | -      | +      | -      | -      | -      | -      | +      |
| Hidrólisis de Gelatina         | -          | +      | -      | -      | -       | +      | -      | +      | -      | -       | -      | -      | +      | -      | +      | +      | -      | +      | +      | +      |
| Almidon                        | -          | -      | -      | -      | -       | -      | -      | +      | -      | +       | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| Crecimiento en McConkey        | -          | -      | -      | -      | -       | -      | -      | -      | -      | -       | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| Consumo de _:                  |            |        |        |        |         |        |        |        |        |         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Glucosa                        | -          | +      | +      | +      | +       | +      | +      | +      | +      | -       | +      | +      | +      | -      | +      | +      | +      | +      | +      | +      |
| Fructosa                       | -          | -      | -      | -      | -       | -      | +      | -      | -      | -       | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| Galactosa                      | -          | -      | +      | -      | +       | +      | +      | -      | -      | -       | -      | -      | +      | +      | +      | +      | +      | -      | -      | +      |
| Maltosa                        | -          | +      | +      | +      | +       | +      | +      | +      | +      | -       | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | -      |
| Manosa                         | +          | +      | +      | -      | +       | +      | +      | -      | +      | -       | -      | +      | +      | +      | +      | -      | +      | +      | -      | +      |
| Sacarosa                       | -          | -      | -      | -      | -       | -      | +      | -      | -      | -       | -      | +      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      |

### IV.3.- Identificación molecular de las bacterias halófilas productoras de EPS.

#### IV.3.1. ARDRA-PCR

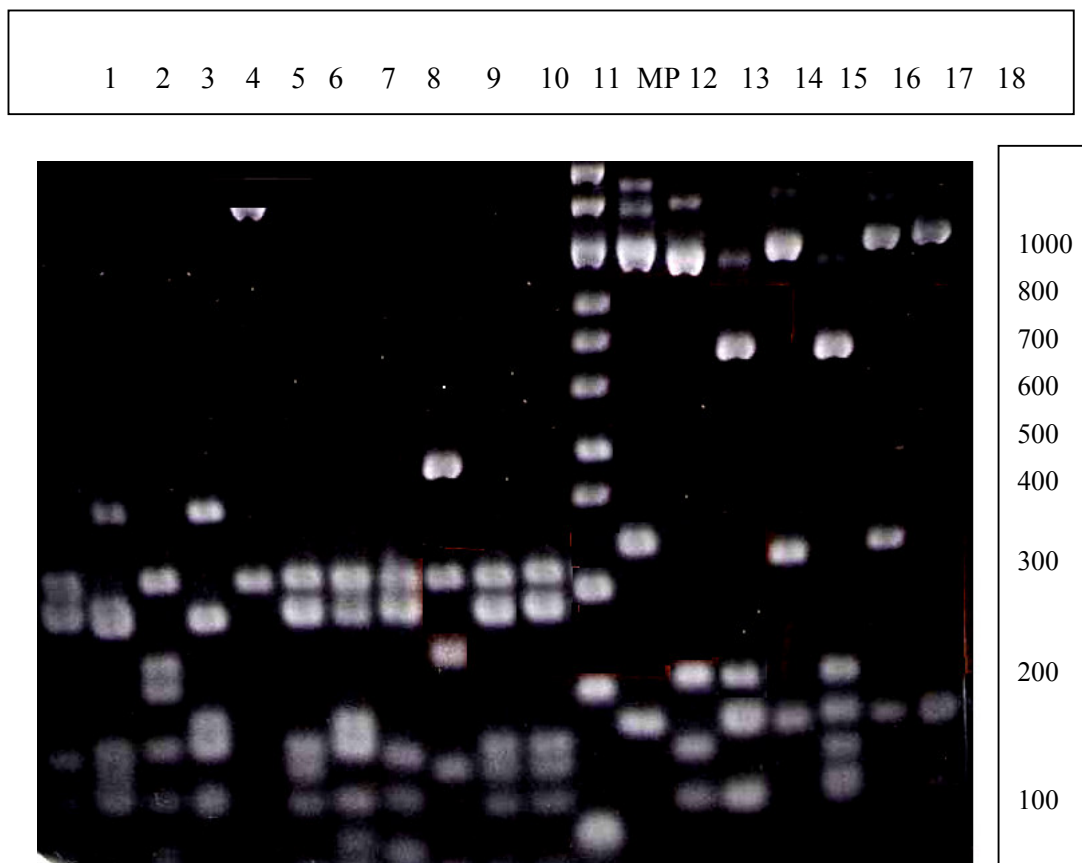
En los 20 aislados se amplificó el ADNr 16S con los cebadores universales 27F y 1651 R, descritos por ser específicos para el dominio Eubacteria, los productos amplificados se separaron por electroforésis en geles de agarosa al 1% cuyo tamaño fue de 1400 pb, lo cual nos indicaría que los aislados seleccionados pertenecen al dominio eubacteria (Fig. 5).



**Figura. N°5. Genes ribosómicos 16S de bacterias halófilas moderadas productoras de EPS, amplificados por PCR. Líneas 1-9 aislados; 10, Marcador Hyperladder II.**

Los productos amplificados fueron digeridos con las enzimas *Cfo* I, *Hae* III, *Hinf* I y *Rsa* I, después de la electroforésis en geles de agarosa al 3% se obtuvieron fragmentos de ADN desde 50 pb hasta 900 pb (figura N°6). El número de bandas obtenidas con las diferentes endonucleasas de restricción (tabla N° 3) varían entre 2 y 7, observándose diferentes patrones de restricción entre los 20 aislados. A partir de los diferentes perfiles de restricción que se obtuvieron se construyó el dendograma de similitud obtenido a partir del coeficiente de similitud (SM) y del método de agrupamiento UPGMA (Fig. N°

7). Los 20 aislados formaron tres grupos diferentes denominados A, B y C a un nivel de 75% de similitud. El grupo A formado por ATA1, ATA6 y ATA4, donde ATA1 y ATA 6 se encuentran mas cercanos entre si que a ATA4. El grupo B, forma un grupo heterogéneo y se puede subdividir a su vez en tres sub grupos: ATA2, ATA5 y ATA3 constituyen el primer sub- grupo; ATA7 y ATA17 forman el segundo sub-grupo, ATA15, ATA18, ATA 19 y ATA20 se encuentran formando el tercer subgrupo y además ATA19 y ATA20 se encuentran en un mismo brazo agrupados con 100 % de similitud entre ellos. El grupo C también es heterogéneo y a su vez se puede sub dividir en 2, el primero formado por ATA8, ATA9 y ATA 10 cercanamente relacionados y el segundo sub grupo formado por ATA11, 12, 13 y 14, donde ATA11 y ATA12 se encuentran agrupados con 100 % de similitud.

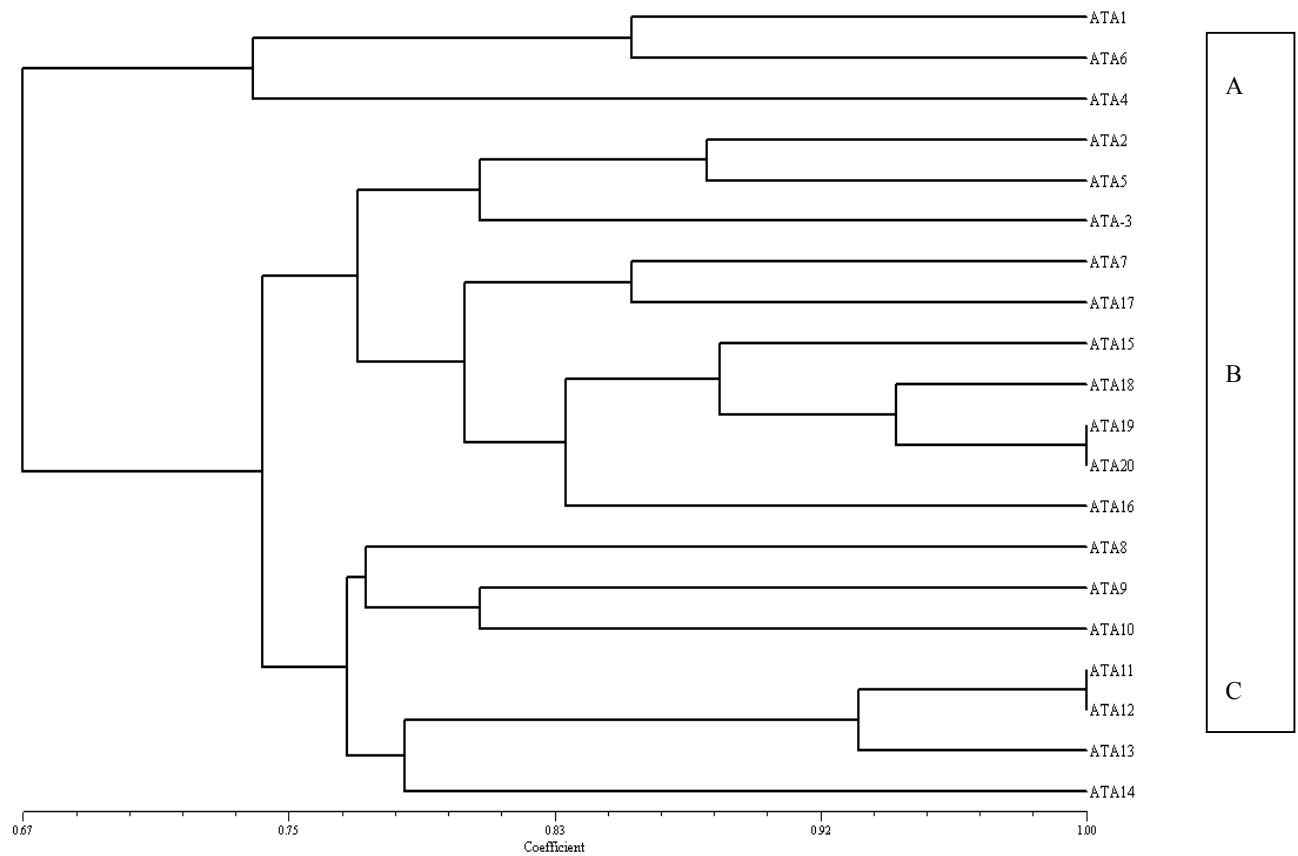


**Figura.Nº6.** ARDRA del ADNr 16 S de bacterias halófilas moderadas productoras de EPS. gel de agarosa al 5%. A.- *Hae* III, líneas 1, ATA1; 2, ATA2; 3, ATA3; 4, ATA4; 5, ATA5; 6, ATA6; 7, ATA7; 8, ATA8; 9, ATA9; 10, ATA10; 11, ATA11; M Marcador Hyperlader II , B.-*Hinf* I 11, ATA1; 12, ATA2; 13, ATA3, 14, ATA4; 14, ATA5; 15, ATA6; 16, ATA7; 17,ATA8; 18 ATA9.

**Tabla N° 3:** Tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos mediante ARDRA, de bacterias halófilas moderadas productoras de EPS,

| Nombre<br>de   | Tamaño de los Fragmentos de restricción de ADNr 16S (pb) |
|--|--|
| aisladas de las minas salinas de Atacocha - Ayacucho |  |

| N° | Aislados | Enzimas de restricción       |                         |                                   |                                   |
|----|----------|------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|    |          | <i>Hae</i> III               | <i>Hinf</i> I           | <i>Cfo</i> I                      | <i>Rsa</i> I                      |
| 1  | ATA1     | 301, 1172                    | 166, 1200               | 100, 259, 288, 321                | 109, 362, 443,                    |
| 2  | ATA2     | 110,172,146,272,301          | 123, 148, 1200          | 159, 182, 214, 272, 321           | 119, 129, 331, 868                |
| 3  | ATA3     | 104,120,146,272,427          | 123, 166, 210, 705      | 78, 123, 142, 159, 177, 214, 288, | 119, 129, 331, 361, 405           |
| 4  | ATA4     | 100, 120, 146, 186, 204, 301 | 166, 324, 1200          | 78, 169, 190, 259, 288, 321       | 149, 247, 398, 525                |
| 5  | ATA5     | 120, 146, 166, 272, 427      | 123, 148, 166, 210, 705 | 123, 159, 182, 214, 321           | 119, 129, 331, 868                |
| 6  | ATA6     | 301, 1172                    | 166, 324, 1000          | 100, 224, 288, 321,               | 129, 484, 525                     |
| 7  | ATA7     | 120, 146, 151, 272, 301      | 123, 166, 1037          | 78, 142, 169, 321, 592            | 119, 129, 361, 796                |
| 8  | ATA8     | 100, 120, 146, 166, 272, 301 | 290, 550,               | 316, 321, 492, 550,               | 119, 129, 420, 443                |
| 9  | ATA9     | 100, 120, 146, 272, 301      | 240, 970                | 177, 204, 299                     | 129, 149, 361, 868                |
| 10 | ATA10    | 100, 146, 204, 301, 457      | 240, 770                | 100, 142, 204, 316, 321,          | 119, 129, 233, 331, 456           |
| 11 | ATA11    | 100, 120, 146, 159, 272, 301 | 240, 1000               | 78, 159, 182, 321                 | 119, 129, 164, 331, 895           |
| 12 | ATA12    | 100, 120, 146, 159, 272, 301 | 240, 1000               | 78, 159, 182, 321                 | 119, 129, 164, 331, 895           |
| 13 | ATA13    | 120,146,166, 272, 427        | 148, 240, 1000          | 78, 159, 182, 321, 621            | 119, 129, 164, 331, 895           |
| 14 | ATA14    | 100, 120, 146, 159, 272, 301 | 100, 166, 265, 601      | 78, 190, 321, 891                 | 119, 129, 149, 247, 331, 484, 525 |
| 15 | ATA15    | 100, 120, 272, 281, 457      | 166, 210, 705           | 78, 123, 169, 190, 224, 253, 299  | 119, 129, 331, 398, 525           |
| 16 | ATA16    | 120, 146, 166, 272, 427,     | 148, 166, 210, 1000     | 142, 182, 224, 253, 299, 321      | 119, 129, 164, 331, 868           |
| 17 | ATA17    | 100, 120, 146, 159, 272, 301 | 123, 166, 210, 705      | 78, 169, 190, 321, 621            | 119, 129, 331, 796                |
| 18 | ATA18    | 100, 120, 146, 159, 272, 301 | 123, 166, 210, 705      | 78, 142, 169, 224, 253, 288,      | 119,129, 331, 420, 484            |
| 19 | ATA19    | 120, 146, 166, 272, 427      | 123, 166, 210, 705      | 78, 142, 169, 190, 224, 253, 299  | 119, 129, 331, 420, 484           |
| 20 | ATA20    | 120, 146, 166, 272, 427      | 123, 166, 210, 705      | 78, 142, 169, 190, 224, 253, 299  | 119, 129, 331, 420, 484           |



**Figura.Nº7. Dendrograma de Similitud UPGMA, generado a partir del ARDRA de bacterias halófilas moderadas productoras de EPS aisladas de las minas salinas de Atacocha - Ayacucho**



#### IV.3.3.- Secuenciación y análisis filogenético de los genes ribosómicos 16S

Se seleccionaron a los aislados ATA3, ATA4, ATA9, ATA11, ATA17 Y ATA20 como representantes de cada uno de los grupos discriminados por el análisis UPGMA del ARDRA y por presentar las mejores características fenotípicas como productoras de EPS. De estos microorganismos se amplificaron los genes ribosómicos 16S y se secuenciaron, como resultado se obtuvieron secuencias parciales entre 600 y 1400 pb, (tabla N°4), en el caso de ATA11 la secuencia parcial corresponde a los primeros 600 pb. Estas secuencias fueron obtenidas empleando 2 primers universales que flanqueaban los extremos de las dos cadenas, con cada uno de los primers se logró amplificar fragmentos de aproximadamente 600pb, las secuencias de las dos cadenas fueron ensambladas mediante el programa Bioedit.

Las secuencias de los aislados fueron comparadas con las secuencias de los genes ADN<sub>r</sub> 16S de bacterias depositadas en la base de datos pública del Banco de Genes (Gene bank) y del proyecto Ribosómico (RDP), en función a este análisis se obtuvieron secuencias de los 100 mejores alineamientos que arrojó el programa BLAST N, las secuencias de las seis bacterias halófilas moderadas productoras de EPS presentaron alto grado de similitud con las especies de los géneros *Halomonas* y *Chromohalobacter*, pero no mostraron homología con otras bacterias halófilas moderadas, ni con otras especies del dominio Eubacteria.

La inferencia filogenética de los aislados productores de EPS se realizó mediante el programa bioinformático Mega 2.1 para lo cual solo se seleccionaron las secuencias de los genes ADN<sub>r</sub> 16S de las diferentes especies del género *Halomonas* y *Chromohalobacter*, que produjo el análisis BLAST N con el requisito de que estas

secuencias pertenezcan a especies debidamente identificadas y publicadas, en función a estos parámetros se construyeron los árboles filogenéticos (figuras 8, 9 y 10) obtenidos por la matriz de similitud de Junkes Cantor. El árbol filogenético basado en el método de los vecinos cercanos claramente evidencia la posición filogenética de los aislados con los miembros de los géneros *Halomonas* y *Chromohalobacter*. Similares estructuras se obtuvieron con los árboles generados por los métodos de Mínima evolución y de Máxima - parsimonia.

La secuencia del ADNr 16S del aislado ATA11, se encuentra cercanamente relacionado con las especies de *Halomonas elongata* ATCC 33173, *Halomonas eurihalina* ATCC 49336 y *Halomonas halmophila* ATCC 19717, con los cuales presenta porcentajes de similitud de 99.6, 99.4 y 97.2%, respaldado en valores bootstrap de 83 y 88% respectivamente.

Los aislados ATA9 y ATA 17, comparten el mismo brazo filogenético con un valor bootstrap del 100 % que indica alta confiabilidad y con porcentaje de similitud entre ellos del 97.2%, además ATA9 y ATA17 forman un brazo filogenético aislados de las demás especies de los géneros *Halomonas* y *Chromohalobacter*, con quienes presenta niveles de similitud menores al 95%.

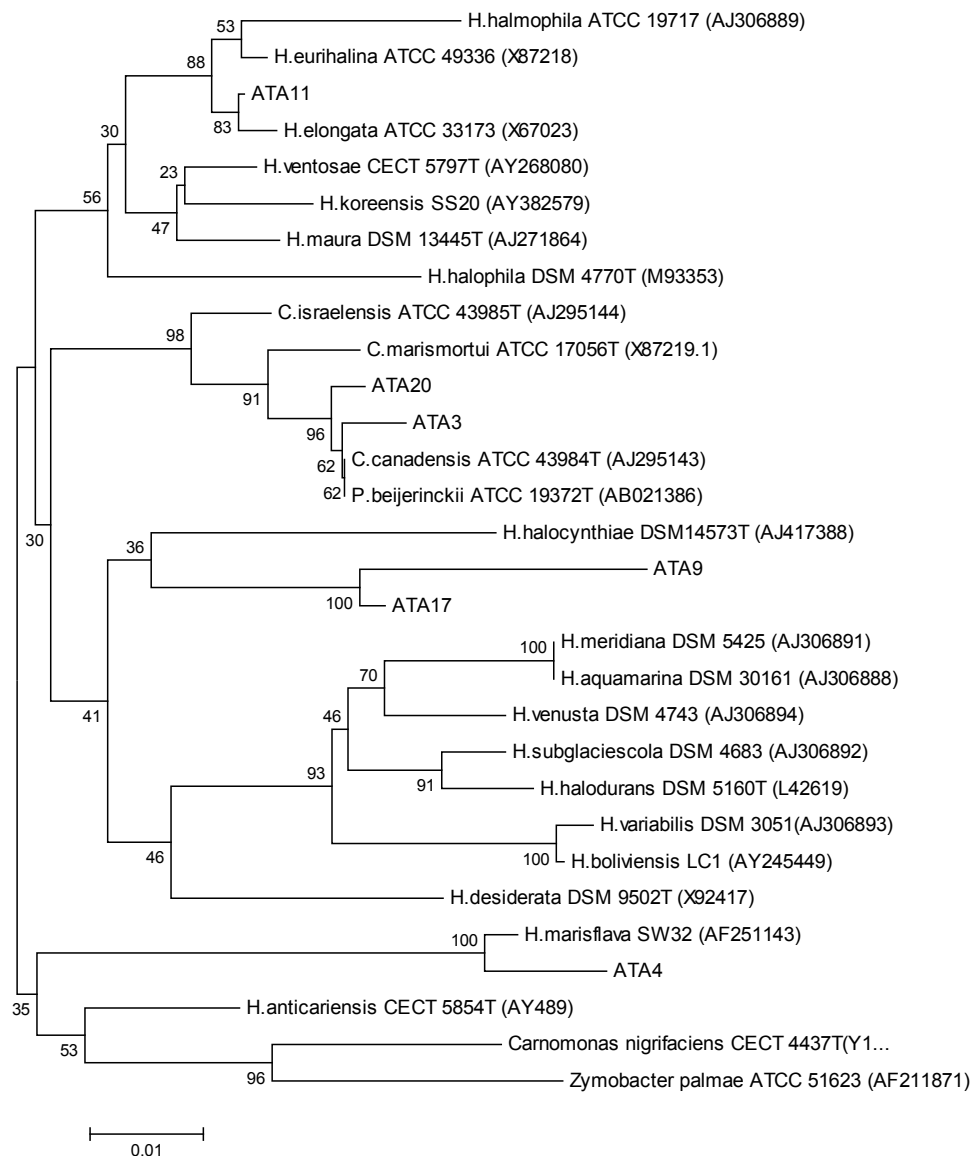
El aislado ATA4 se encuentra compartiendo la misma rama con *Halomonas marisflavae* SW32, con la que presenta un valor bootstrap de 100% y porcentaje de similitud de 98.6%, exhibiendo valores menores al 93% de similitud con el resto de especies del género *Halomonas*.

Los aislados ATA 3 y ATA 20, se encuentran cercanamente relacionados a las especies: *Chromohalobacter marismortui* ATCC 17056T (98.0% y 98.2%) *Chromohalobacter canadensis* ATCC 43984T (94.0% y 96.0%), *Chromohalobacter israelensis* ATCC

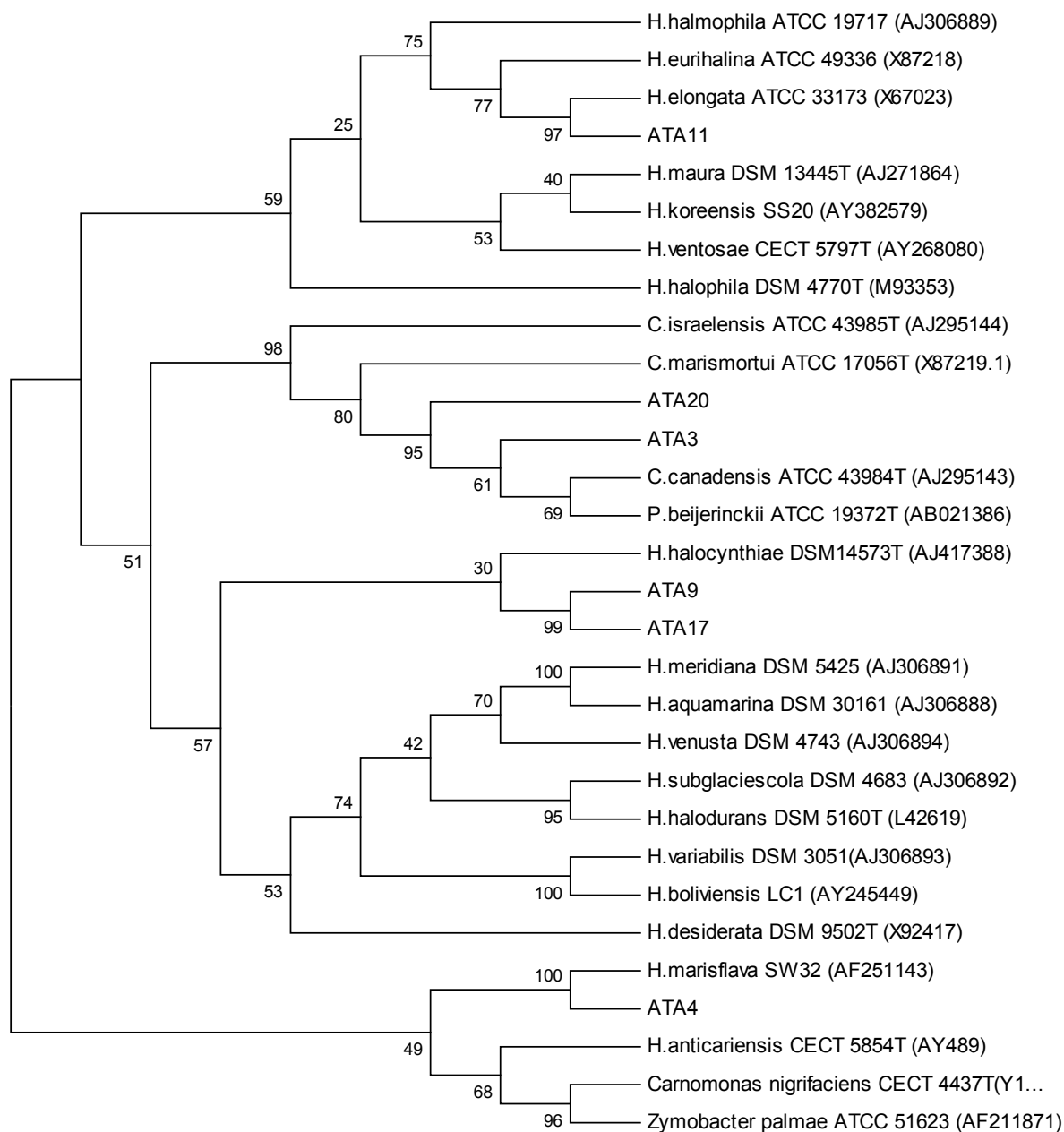
43985T (97.0% y 97.4%), *Pseudomona beijerinckii* ATCC 19372T (94.0% y 96.0%), con estas se encuentran relacionados con valor bootstrap del 98%. Además ATA3 y ATA20 presentan 99 % de similitud entre ellas y menos de 95% de similitud con las especies restantes del género *Halomonas*.

**Tabla N°4:** Tamaño de las secuencias de los genes ribosómicos 16S de seis bacterias halófilas moderadas productoras de EPS, aisladas de las minas salinas de Atacocha - Ayacucho.

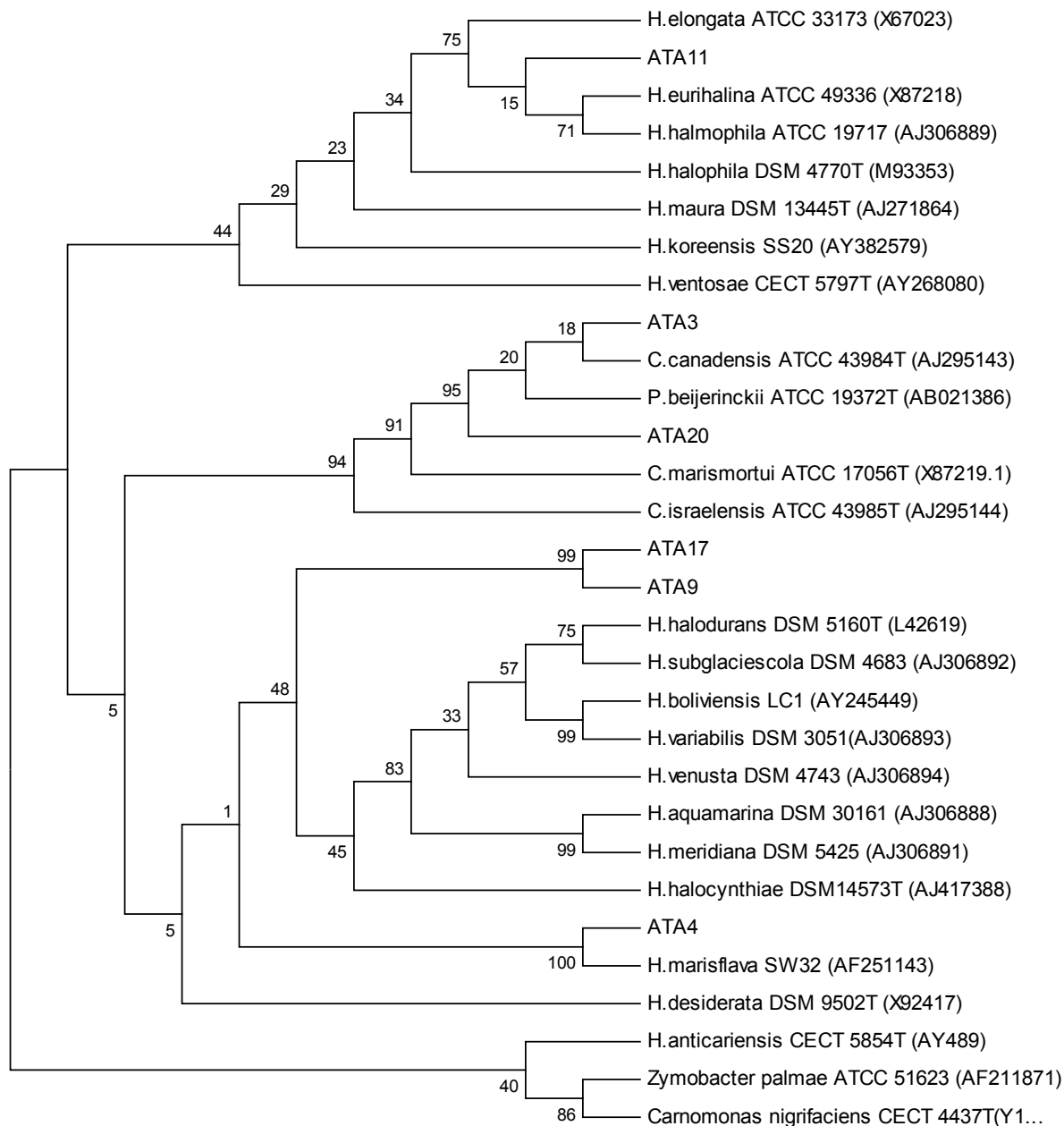
| Aislados | Tamaño de secuencias Amplificadas |
|----------|-----------------------------------|
|          | ( pb)                             |
| ATA3     | 1465                              |
| ATA4     | 1295                              |
| ATA 9    | 1406                              |
| ATA11    | 647                               |
| ATA17    | 1429                              |
| ATA20    | 1307                              |



**Figura. N°08.** Árbol filogenético de los vecinos cercanos construido por comparación de las secuencias parciales de los ADN<sub>r</sub>16S, entre ATA3, ATA4, ATA9, ATA11, ATA17 y ATA20 productores de EPS aislados de las minas salinas de Atacocha - Ayacucho y los miembros de la familia *Halomonadaceae*. El número de acceso del “Gene bank” de las cepas tipo usadas en el análisis filogenético se muestran en paréntesis, *Zymobacter palmae* ATCC 51623 y *Carnimonas nigrificiens* CECT 5854<sup>T</sup> fueron usados como grupos externos. Escala de 0.01 substituciones por nucleótido. Valor bootstrap de 1000 replicaciones.



**Figura N°09.** Árbol filogenético Mínima evolución construido por comparación de las secuencias parciales de los ADN<sub>r</sub>16S, entre ATA3, ATA4, ATA9, ATA11, ATA17 y ATA20 productoras de EPS aisladas de las minas salinas de Atacocha - Ayacucho y los miembros de la familia *Halomonadaceae*. El número de acceso del “Gene bank” de las cepas tipo usadas en el análisis filogenético se muestran en paréntesis, *Zymobacter palmae* ATCC 51623 y *Carnimonas nigrificiens* CECT 5854<sup>T</sup> fueron usados como grupos externos. Escala de 0.01 substituciones por nucleótido. Valor bootstrap de 1000 replicaciones



**Figura N° 10.-** Árbol filogenético Máxima- parsinomia construido por comparación de las secuencias parciales de los ADN<sub>r</sub>16S, entre ATA3, ATA4, ATA9, ATA11, ATA17 y ATA20 productores de EPS aislados de las minas salinas de Atacocha - Ayacucho y los miembros de la familia *Halomonadaceae*. El número de acceso del “Gene bank” de las cepas tipo usadas en el análisis filogenético se muestran en paréntesis, *Zymobacter palmae* ATCC 51623 y *Carnimonas nigrificiens* CECT 5854<sup>T</sup> fueron usados como grupos externos. Escala de 0.01 substituciones por nucleótido. Valor bootstrap de 1000 repeticiones

**Tabla Nº5.** Distancias evolutivas y niveles de similitud de las secuencias parciales de los ADNr 16S de 6 aislados de bacterias halófilas moderadas productores de EPS procedentes de la minas salinas de Atacocha - Ayacucho y diferentes especies de la familia *Halomonadaceae*, calculadas por la ecuación de Jukes – Cantor.

|   | 1     | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   | 26   | 27   | 28    | 29    | 30   |      |  |
|---|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|------|------|--|
| [ 1] Carnomonas_nigrificans_CECT_4437T          | 90.5  | 90.5 | 90.5 | 90.9 | 90.5 | 91.8 | 92   | 91.2 | 93.5 | 93.5 | 92.7 | 91.4 | 92.7 | 92.7 | 92.7 | 94.8 | 92   | 94.8 | 93.1 | 92.7 | 90.9 | 92.7 | 92.7 | 95.4 | 91.4 | 90.7 | 92.2 | 92    | 90.9  | 93.5 | 92.9 |  |
| [ 2] H.meridiana_DSM_5425_(AJ306891)            | 0.095 |      | 100  | 97.4 | 95.6 | 96.4 | 96.8 | 94.8 | 92.9 | 92.7 | 94.6 | 92.5 | 93.5 | 93.5 | 94.2 | 93.1 | 93.1 | 90.9 | 93.7 | 92   | 95.2 | 92.7 | 92.7 | 89.6 | 91.6 | 90.7 | 93.3 | 93    | 91.8  | 93.9 | 92.2 |  |
| [ 3] H.aquamarina_DSM_30161_(AJ306888)          | 0.095 | 0    |      | 97.4 | 95.6 | 96.4 | 96.8 | 94.8 | 92.9 | 92.7 | 94.6 | 92.5 | 93.5 | 93.5 | 94.2 | 93.1 | 93.1 | 90.9 | 93.7 | 92   | 95.2 | 92.7 | 92.7 | 89.6 | 91.6 | 90.7 | 93.3 | 93    | 91.8  | 93.9 | 92.2 |  |
| [ 4] H.venusta_DSM_4743_(AJ306894)              | 0.091 | 0.03 | 0.03 |      | 96.6 | 96.8 | 97.4 | 93.9 | 92.7 | 92.2 | 94.2 | 92.7 | 94.4 | 94.4 | 93.7 | 93.5 | 93.3 | 92.7 | 94.6 | 92.2 | 96.2 | 93.5 | 91.2 | 91.4 | 90.7 | 94.2 | 94   | 92.9  | 95    | 92.5 |      |  |
| [ 5] H.variabilis_DSM_3051_(AJ306893)           | 0.095 | 0.04 | 0.04 | 0.03 |      | 96.4 | 96.6 | 94.2 | 92   | 91.6 | 92.2 | 92   | 93.3 | 93.3 | 93.1 | 93.3 | 92.7 | 91.8 | 93.3 | 91.6 | 99.6 | 92.9 | 89.2 | 89.8 | 89.2 | 93.1 | 93   | 92.5  | 94.6  | 91.8 |      |  |
| [ 6] H.subglaciescola_DSM_4683_(AJ306892)       | 0.082 | 0.04 | 0.04 | 0.03 | 0.04 |      | 98.6 | 93.9 | 93.7 | 93.5 | 94.2 | 92.2 | 94.2 | 94.2 | 93.5 | 93.9 | 93.9 | 92   | 94.4 | 92.9 | 96   | 93.5 | 90.1 | 90.7 | 89.8 | 94.2 | 93   | 92.9  | 94.4  | 93.1 |      |  |
| [ 7] H.halodurans_DSM_5160T_(L42619)            | 0.08  | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.01 |      | 93.7 | 93.1 | 92.9 | 94.2 | 92.5 | 93.7 | 93.7 | 93.1 | 93.5 | 93.3 | 92   | 93.7 | 92.2 | 96.2 | 92.9 | 90.5 | 90.9 | 90.1 | 93.5 | 94   | 92    | 94.2  | 92.5 |      |  |
| [ 8] H.desiderata_DSM_9502T_(X92417)            | 0.088 | 0.05 | 0.05 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 |      | 94.2 | 92.2 | 92.5 | 93.1 | 94.4 | 94.4 | 95   | 94.8 | 95   | 93.5 | 95.2 | 93.7 | 94.6 | 94.4 | 91.6 | 92.2 | 91.2 | 93.9 | 94   | 91.6  | 93.9  | 93.9 |      |  |
| [ 9] H.eurhalina_ATCC_49336_(X87218)            | 0.065 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.06 | 0.07 | 0.06 |      | 97.8 | 93.7 | 95.8 | 95.4 | 95.4 | 95.2 | 96.2 | 97.4 | 95.6 | 97.4 | 99.2 | 92.5 | 96.8 | 92.2 | 93.7 | 92.9 | 95.4 | 95   | 91.6  | 93.7  | 99.4 |      |  |
| [ 10] H.halophilae_ATCC_19717_(AJ306889)        | 0.065 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.02 |      | 93.9 | 93.5 | 94.2 | 94.2 | 93.9 | 95   | 95.6 | 93.7 | 95.6 | 97   | 92   | 94.8 | 91.2 | 92   | 91.2 | 94.2 | 94   | 90.9  | 93.1  | 97.2 |      |  |
| [ 11] H.halocynthiae_DSM14573T_(AJ417388)       | 0.073 | 0.05 | 0.05 | 0.06 | 0.08 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 |      | 91.8 | 92.7 | 92.7 | 92   | 93.3 | 93.5 | 92.5 | 93.9 | 92.9 | 92.7 | 93.5 | 92   | 92.2 | 91.2 | 92.7 | 92   | 92.7  | 94.8  | 93.1 |      |  |
| [ 12] H.halophila_DSM_4770T_(M93353)            | 0.086 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.04 | 0.07 | 0.08 |      | 93.7 | 93.7 | 93.5 | 94.4 | 95.6 | 94.4 | 95.4 | 96   | 92.5 | 96   | 93.1 | 92.5 | 91.2 | 93.3 | 93   | 90.7  | 93.3  | 96.4 |      |  |
| [ 13] C.canadensis_ATCC_43984T_(AJ295143)       | 0.073 | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.05 | 0.06 | 0.07 | 0.06 |      | 100  | 98.6 | 97.8 | 94.6 | 94.6 | 96.2 | 94.8 | 93.7 | 94.8 | 91.6 | 92.7 | 92.2 | 96   | 94   | 92    | 94.8  | 95   |      |  |
| [ 14] P.beijerinckii_ATCC_19372T_(AB021386)     | 0.073 | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.05 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.06 |      | 98.6 | 97.8 | 94.6 | 94.6 | 96.2 | 94.8 | 93.7 | 94.8 | 91.6 | 92.7 | 92.2 | 96   | 94   | 92    | 94.8  | 95   |      |  |
| [ 15] C.marismortui_ATCC_17056T_(X87219.1)      | 0.073 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.05 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0    |      | 97.8 | 94.6 | 94.6 | 96.2 | 94.8 | 93.7 | 94.8 | 91.6 | 92.7 | 92.2 | 96   | 94   | 92    | 94.8  | 95   |      |  |
| [ 16] C.israelensis_ATCC_43985T_(AJ295144)      | 0.052 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.07 | 0.05 | 0.04 | 0.05 | 0.07 | 0.06 | 0.02 | 0.02 |      | 95.4 | 95.2 | 96.4 | 95.6 | 93.7 | 95   | 92.7 | 93.5 | 93.1 | 97.4 | 97   | 92.7  | 95.4  | 95.8 |      |  |
| [ 17] H.maura_DSM_13445T_(AJ271864)             | 0.08  | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.05 | 0.03 | 0.04 | 0.07 | 0.04 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |      | 95.8 | 98.4 | 97.6 | 93.1 | 97.8 | 92.5 | 93.1 | 91.8 | 94.6 | 94   | 92.2  | 94.4  | 98   |      |  |
| [ 18] H.anticariensis_CECT_5854T_(AY489)        | 0.052 | 0.09 | 0.09 | 0.07 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.04 | 0.06 | 0.08 | 0.06 | 0.05 | 0.05 | 0.06 | 0.05 | 0.04 |      | 96.8 | 98.4 | 97.6 | 93.1 | 97.8 | 92.5 | 93.1 | 91.8 | 94.6 | 94    | 92.2  | 94.4 | 98   |  |
| [ 19] H.ventosae_CECT_5797T_(AY268080)          | 0.069 | 0.06 | 0.06 | 0.05 | 0.07 | 0.06 | 0.06 | 0.05 | 0.03 | 0.04 | 0.06 | 0.05 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.02 | 0.03 |      | 97.6 | 93.7 | 98.2 | 93.1 | 93.5 | 92.7 | 96.2 | 96   | 92.9  | 95    | 98   |      |  |
| [ 20] H.elongata_ATCC_33173_(X67023)            | 0.073 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | 0.06 | 0.01 | 0.03 | 0.07 | 0.04 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0.02 | 0.04 | 0.02 | 0.03 |      | 92   | 93   | 92.5 | 93.9 | 93.1 | 94.8 | 94    | 91.2  | 93.3 | 99.6 |  |
| [ 21] H.boliviensis_LC1_(AY245449)              | 0.091 | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0    | 0.04 | 0.04 | 0.05 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.08 | 0.06 | 0.08 |      | 93.3 | 89.6 | 89.8 | 89.2 | 93.5 | 93   | 92.9  | 95    | 92.2 |      |  |
| [ 22] H.koreensis_SS20_(AY382579)               | 0.073 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.03 | 0.05 | 0.07 | 0.04 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.02 | 0.04 | 0.02 | 0.03 | 0.07 |      | 92.9 | 92.5 | 91.2 | 94.8 | 94   | 92.9  | 95    | 97.4 |      |  |
| [ 23] Zymobacter_palmarum_ATCC_51623_(AF211871) | 0.046 | 0.1  | 0.1  | 0.09 | 0.11 | 0.1  | 0.1  | 0.08 | 0.08 | 0.09 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | 0.08 | 0.09 | 0.07 | 0.08 | 0.05 | 0.07 | 0.08 | 0.1  | 0.07 |      | 92.9 | 91.6 | 91.2 | 91   | 90.5  | 92.9  | 92.9 |      |  |
| [ 24] H.marisflava_SW32_(AF251143)              | 0.086 | 0.08 | 0.08 | 0.09 | 0.1  | 0.09 | 0.09 | 0.08 | 0.06 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.1  | 0.08 | 0.07 |      | 98.6 | 92.2 | 92   | 90.3  | 92.2  | 93.9 |      |  |
| [ 25] AT44                                      | 0.093 | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.11 | 0.1  | 0.1  | 0.09 | 0.07 | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.07 | 0.11 | 0.09 | 0.08 | 0.01 |      | 91.8 | 92   | 90.3  | 91.2  | 93.1 |      |  |
| [ 26] AT420                                     | 0.078 | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.05 | 0.06 | 0.07 | 0.07 | 0    | 0    | 0.02 | 0.03 | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0.05 | 0.07 | 0.05 | 0.09 | 0.08 | 0.08 | 0.01 | 99   | 91.6  | 94.4  | 95   |      |  |
| [ 27] AT43                                      | 0.08  | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.05 | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.03 | 0.06 | 0.06 | 0.04 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.09 | 0.08 | 0.08 | 0.01 |      | 92.5  | 95.2  | 94.4 | 95   |  |
| [ 28] AT49                                      | 0.091 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.09 | 0.07 | 0.09 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.09 | 0.07 | 0.1  | 0.1  | 0.1  | 0.1  | 0.08 | 0.1   |       | 97.2 | 91.4 |  |
| [ 29] AT417                                     | 0.065 | 0.06 | 0.06 | 0.05 | 0.05 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.05 | 0.07 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.06 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.07 | 0.05 | 0.05 | 0.07 | 0.08 | 0.09 | 0.06 | 0     | 0.028 |      | 93.5 |  |
| [ 30] AT411                                     | 0.071 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | 0.06 | 0.01 | 0.03 | 0.07 | 0.04 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0.02 | 0.04 | 0.02 | 0    | 0.08 | 0.03 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.05 | 0.1  | 0.086 | 0.07  |      | 0.07 |  |

## V.- DISCUSIÓN

Las minas salinas de Atacocha, se encuentran ubicadas a 41 Km. al Nor este de la ciudad de Ayacucho y a 3200 m.s.n.m, presenta ciertas peculiaridades ambientales como las fluctuaciones de temperatura y precipitaciones fluviales. Estas minas fueron de gran importancia económica para los pobladores de la región, ya que su explotación les abastecía de sal, sin embargo con el pasar de los años, esta actividad minera ha sido abandonada.

Las sales recolectadas de este ambiente fueron sales sólidas de diferentes colores, (anexo 2 y 3) denominadas sal rosa, blanca y azul, estas coloraciones podrían deberse a la diferente composición de minerales, debido a que los ambientes salinos e hipersalinos se caracterizan por presentar una elevada concentración de sal además de alto contenido en iones, haciéndolos inhóspitos para la mayoría de microorganismos (17, 18, 24), aunque estudios en estos ambientes han puesto de manifiesto la existencia de una compleja microbiota adaptada a la halofilia (6, 28, 73). Así mismo, estudios realizados en minas salinas asociando ciertos parámetros como concentración salina, composición iónica, concentración de oxígeno, pH y temperatura muestran una amplia diversidad de microorganismos halófilos (1, 2, 7).

En función a las características morfológicas y fisiológicas, los aislados de las sales de las salinas de Atacocha son bacilos Gram negativos y se encuentran en el grupo de halófilos moderados (6), por crecer óptimamente en el rango de 3 a 15 % de NaCl y presentar amplia tolerancia salina. Estas características son comunes de las bacterias halófilas moderadas, precisamente la capacidad de tolerar elevadas concentraciones



salinas que permiten distinguir entre las especies de halófilos moderados, el crecimiento varia también en función a la temperatura y a los nutrientes disponibles (3). Las bacterias halófilas moderadas están presentes en una gran variedad de ambientes hipersalinos y ello debido a su capacidad para crecer y desarrollarse en un amplio rango de salinidades (2, 17, 25). Investigaciones similares realizadas por Fernández-Jerí y col (81, 82), en otros ambientes salinos del Perú revelaron que la población de bacterias halófilas moderadas con amplia tolerancia al NaCl es la población mayoritaria de estos ambientes. Por otro lado, estudios realizados en suelos hipersalinos (73, 88, 83), han demostrado que los microorganismos halófilos moderados capaces de crecer entre 0.9 y 20% de sales totales y con un crecimiento óptimo de 10 %, son los mas abundantes destacando la presencia de los géneros *Halomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Nesterkonía*.

En la presente investigación se seleccionaron 20 aislados de bacterias halófilas moderadas productoras de EPS, que presentaron crecimiento gomoso en el medio sólido MY, característica que permite seleccionar cepas productoras de EPS, los primeros estudios realizados con bacterias halófilas moderadas productoras de EPS fueron descritos por Quesada y col, 1993 (61), Calvo y col, 1995 (62), ellos describieron la producción del EPS V2-7, en *H.eurihalina* F2-7, este EPS presentó viscosidad intermedia y termoestabilidad, posteriormente en la búsqueda de bacterias halófilas moderadas productoras de EPS, se demostró que estas se encuentran formando parte principalmente del género *Halomonas*, tal como lo demuestran los estudios realizados por Martínez Canovas y col, 2004 (84), quienes identificaron fenotípicamente bacterias halófilas moderadas Gram negativas y productoras de EPS provenientes de 18 habitats salinos, relacionándolos con el género *Halomonas*, en función a estas investigaciones

las bacterias halófilas moderadas Gram negativas productoras de EPS aisladas de Atacocha podrían pertenecer al género *Halomonas*. Por otro lado, las características bioquímicas y nutricionales de los aislados, son muy diferentes entre ellos, además difieren en algunas características con el resto de las especies descritas para el género *Halomonas* (Anexo 6) lo cual no es raro ya que este género se caracteriza por ser heterogéneo además esta constituido de especies que en base a sus características fenotípicas fueron identificadas como miembros de los géneros: *Flavobacterium*, *Volcaniella*, *Deleya* y *Halovibrium*, pero en base al análisis de las secuencias de los genes ADNr 16S se reclasificaron dentro del género *Halomonas*.

Según el dendograma UPGMA, generado a partir de los resultados del ARDRA, los 20 aislados se encuentran divididos en 3 grupos heterogéneos, cada uno con sus respectivos subgrupos, sólo ATA19 y ATA20, así como ATA11 y ATA12 presentan 100% de similitud entre ellos, éstos son genotípicamente idénticos pero fenotípicamente diferentes, como lo demuestran algunas características fenotípicas estudiadas como por ejemplo el consumo de azúcares como única fuente de carbono (Tabla N° 2).

De los análisis fenotípicos y del ARDRA se evidencia que los 20 aislados son cepas de bacterias halófilas moderadas diferentes.

Las secuencias parciales de los genes ribosómicos 16S de los aislados: ATA4, ATA9, ATA11 y ATA17 presentan niveles de similitud menores al 97% entre ellas, según el criterio descrito por Stackebrandt y Goebel, 1994 (85) porcentajes de similitud en las secuencias de los genes ribosómicos 16S menores al 97% sugieren que las cepas estudiadas no pertenecen a la misma especie, por lo que los aislados productores de EPS de Atacocha son especies diferentes a excepción de ATA20 y ATA3, que presentan 99% de similitud entre ellas, sin embargo, se trataría de cepas diferentes de la misma

especie ya que según el dendograma UPGMA ambas se encuentran formando parte del grupo B pero a su vez ocupan diferentes sub- grupos.

En función a los resultados del análisis filogenético los aislados ATA4, ATA11, ATA9 y ATA17 se encuentran cercanamente relacionados con diferentes especies del género *Halomonas*, lo cual confirma la hipótesis elaborada en base a las características fenotípicas. El género *Halomonas*, es uno de los mas grandes dentro de los halófilos moderados y fue inicialmente propuesto por Vreeland y col, 1993 (5) como miembros de la familia *Halomonadaceae* perteneciente a la  $\gamma$  sub - clase de las proteobacterias, con una única especie *Halomonas elongata*, posteriormente revisado por Dobson y Franzman, 1996 (26) quienes aislaron a las primeras especies de alcalalófilos como *H. pantelleriensis* y *H. desiderata*. A la fecha, se han descrito mas de 30 especies dentro del género *Halomonas* todas ellas aisladas de diferentes ambientes terrestres y acuáticos, de muestras de alimentos, superficies rocosas, en casi todos los continentes (17, 18, 20, 24,28,39). La mayoría de especies aisladas son productoras de interesantes metabolitos, tales como EPS, solutos compatibles, polihidroxialcanoatos, también son capaces de degradar compuestos aromáticos.

El aislado nativo ATA11 se encuentra filogenéticamente relacionado a las especies de *H. elongata* y *H. eurihalina*, con porcentajes de similitud cercanos de 99.6 y 99.4% respectivamente. Sin embargo, las características fenótípicas entre ATA11 y las dos especies mencionadas (tabla N° 08) muestran que ATA11 comparte mas características fenotípicas con *H. eurihalina* que con *H. elongata*, por lo siguiente: *H. elongata*, ha sido descrita por su capacidad de crecer en ausencia de sal, mientras que *H. eurihalina* crece a partir de 0.5 % de NaCl, en tanto que ATA11 no crece en ausencia de sal, y lo hace a partir del 2% de NaCl, ATA11 como *H. eurihalina* no presentan motilidad. El aislado

ATA11 no hidroliza gelatina y produce EPS, por lo tanto en base a las características fenotípicas y los datos filogenéticos, el aislado ATA11, puede ser identificado como la especie *H. eurihalina*, aunque es diferente a la cepa tipo en la producción de H<sub>2</sub>S, el crecimiento en agar Mc Conkey, que ha sido descrito como positivo para *H. eurihalina* ATCC49336 pero que es negativo para el aislado ATA11. *H. eurihalina* pertenece al grupo de bacterias halófilas moderadas, productoras de EPS, fue aislada de suelos salinos y descrita por Quesada y col, 1990 (86), esta especie fue la primera dentro del género *Halomonas* reportada como productora de EPS, además los mismos investigadores aislaron a un grupo de cepas pertenecientes a la especie de *H. eurihalina*, con capacidad de producir EPS. Bejar y col, 1998 (63), estudiaron la composición química y propiedades reológicas de los EPS producidos por 19 cepas de *H. eurihalina*, describieron que cada cepa producía un tipo de EPS diferente en composición y características reológicas, todas las cepas presentaron el mismo tipo de azúcar neutro y solo diferían en la composición de ácidos urónicos, hexosaminas, acetilo y contenido de sulfato. Posteriormente el mismo grupo de investigación (62, 64, 65) reveló que las condiciones de cultivo influyen en la composición química y en las propiedades físicas de los EPS, siendo la característica mas importante de éstos su capacidad de incrementar la viscosidad de soluciones a bajos valores de pH, tolerancia a la temperatura y a elevadas concentraciones salinas, además de su capacidad de emulsificar varios compuestos hidrocarbonados.

Los aislados ATA9 y ATA17 se encuentran formando un mismo brazo filogenético con 97.2% de similitud, fenotípicamente los aislados difieren entre ellos (Tabla N°2), según el ARDRA, ambas se encuentran formando parte de dos grupos diferentes, ATA9 se encuentra dentro del grupo C y ATA17 en el grupo B, por lo que se trata de especies

diferentes, además que no se encuentran relacionados filogenéticamente ni fenotípicamente con ninguna de las especies descritas hasta la fecha como productoras de EPS, como es el caso de *H. eurihalina*, *H. maura*, *H. ventosae*, *H. anticariencis*, ni con las demás especies del género *Halomonas* con las que presentan porcentajes de similitud menores al 95% y porcentajes mucho menores con el resto de especies de la familia *Halomonadaceae*. Este hecho se debe a que el género *Halomonas* es muy heterogéneo, tal como lo demuestran los estudios realizados por Arhal y col 2001 (41) quienes han dividido a este género en tres grupos filogenéticos en función al análisis de los genes ribosómicos 16S y 23S, por otro lado, Mata y col, 2002 (74), analizaron 234 características fenotípicas de 21 especies pertenecientes al género *Halomonas*, los investigadores estudiaron minuciosamente las características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, nutricionales y la susceptibilidad antimicrobiana, sus resultados demostraron que con un nivel de similitud de 65% las diferentes especies estudiadas constituyen tres grupos en base a la capacidad de producir ácidos a partir de azúcares y al uso de una gran diversidad de sustratos como única fuente de carbono. Por otro lado, Martínez Canovas y col, 2004 (84), estudiaron 135 características fenotípicas en 134 aislados de bacterias halófilas moderadas productoras de EPS, y las compararon con 24 cepas tipo de especies del género *Halomonas*, encontraron que los aislados forman seis grupos, los tres primeros grupos se encontraban asociados a las especies *H. eurihalina* y *H. maura* descritas como productoras de EPS, los otros tres grupos de aislados no se agruparon fenotípicamente con ninguna de las cepas de referencia, constituyendo nuevas especies productoras de EPS, estudios posteriores realizados por el mismo grupo de investigación (87), identificaron a tres aislados de uno de estos grupos proponiendo el nombre de *Halomonas anticariensis* sp. nov.

El grado de similitud de ATA4 es de 98.6% con *Halomonas marsiflavae* y menos del 93% con el resto de especies comparadas del género *Halomonas* y *Chromohalobacter*. *H. marsiflavae*, fue aislada del Mar Amarillo en Korea por Yoon y col, 2001 (88), descrita por formar un linaje evolutivo filogenéticamente diferente entre el grupo de especies que forman el género *Halomonas* y los géneros *Zymobacter* y *Carnimonas*. Los resultados fenotípicos obtenidos para ATA4 al ser comparados con los reportados para *H. marsiflavae* muestran diferencias en el rango de tolerancia a la sal, ATA4 presenta tolerancia al NaCl entre 5 y 20% en tanto que el de *H. marsiflavae* es mucho menor va desde 0.5 % de NaCl, encontrando su óptimo de crecimiento a partir de 0.5%, por lo que no se encuentra dentro del grupo de halófilos moderados, también se diferencian en el rango de tolerancia a la temperatura en *H. marsiflavae* es entre 4 y 37 °C, en tanto que ATA4 no presentó crecimiento a temperaturas de 4°C, sin embargo se tiene que considerar que el autor utilizó como medio de cultivo agar soya tripticasa suplementado únicamente con NaCl, para el crecimiento de *H. marsiflavae*, al respecto Franzman y col, 1988 (19) describieron que las especies del género *Halomonas* crecen en un amplio rango de NaCl que va desde 0.2 al 25% y ello depende del tipo de medio usado, los medios complejos tienden a soportar crecimientos por encima del rango además las características de las colonias como color, forma y apariencia varían; otra diferencia es el crecimiento en medio Mc Conkey aparentemente casi todas las especies del género *Halomonas* presentan esta característica, sin embargo ninguno de los aislados crecieron en este medio.

Los niveles de similitud entre ATA 3 y ATA 20 fueron de 99% entre ellos lo cual evidencia claramente que se trata de la misma especie según el criterio de Stackebrandt y Goebel, 1994 (85). Aunque se trata de cepas diferentes según los resultados de las

características fenotípicas y el ARDRA. ATA3 y ATA20 presentan diferencias morfológicas y fisiológicas, el rango de tolerancia así como el óptimo crecimiento en NaCl es diferente entre ambas, lo mismo se nota en cuanto al rango de temperatura, por otro lado entre las pruebas bioquímicas ATA20 hidroliza almidón y ATA 3 no, tal como se presenta en la Tabla N° 2. El ARDRA evidencia la posición de ambos en el grupo B, formando parte de dos sub grupos diferentes. El análisis filogenético demuestra que ATA3 y ATA20 se encuentra compartiendo el mismo brazo con las especies del género *Chromohalobacter*, presentan alrededor del 98% de similitud, con las especies *C. canadensis*, *C. israelensis*, y menos de 95% con las especies restantes del género *Halomonas*. Además las características fenotípicas de los aislados y de las especies de *Chromohalobacter*, demuestran que ATA3 y ATA20 son más parecidos fenotípicamente a estas especies que a las del género *Halomonas* (tabla N° 06), a la fecha la producción de EPS en miembros del género *Chromohalobacter* no ha sido reportado, sin embargo los aislados de ésta investigación presentan esta peculiaridad, por lo que evidentemente se trata de nuevas especies dentro de este género aunque es necesario realizar estudios polifásicos para poder determinar exactamente la posición filogenética, ya que los géneros *Halomonas* y *Chromohalobacter* comparten muchas similitudes, tal como demuestran los estudios realizados por Arahal y col (41, 42), quienes reevaluaron el estatus filogenético de la familia *Halomonadaceae*, agrupando a las especies de *Chromohalobacter* en un brazo filogenético separado a las del género *Halomonas*, tal como se presenta en el árbol filogenético construido para el presente estudio. Además reclasificaron a las especies de *H. canadiensis* y *H. israelensis* dentro del género *Chromohalobacter* en función al análisis del ADNr 16S y 23S (41).





**Tabla N°6** Características fenotípicas de las cepas ATA3, ATA4, ATA11, ATA17, ATA 20 y otras especies del género *Halomonas* y *Chromohalobacter*.

| Características                  | 1             | 2            | 3            | 4            | 5            | 6            | 7             | 8            | 9            | 10           | 11           | 12              | 13           | 14              | 15            | 16             |
|----------------------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|---------------|----------------|
| Morfología                       | bastón blanco | bastón melón | bastón melón | bastón crema | bastón crema | bastón crema | bastón blanco | bastón Crema | bastón crema | bastón crema | bastón crema | bastón amarillo | bastón crema | bastón amarillo | bastón blanco | bastón ninguno |
| Pigmentación                     | +             | +            | +            | +            | +            | +            | -             | +            | +            | +            | -            | -               | ND           | ND              | ND            | ND             |
| Producción de EPS                | +             | -            | -            | -            | -            | -            | +             | -            | -            | +            | +            | +               | +            | +               | +             | -              |
| Motilidad                        | +             | +            | +            | +            | +            | +            | +             | +            | +            | +            | +            | +               | +            | +               | +             | +              |
| Aerobios                         | -             | -            | -            | -            | -            | -            | -             | -            | +            | +            | +            | -               | -            | +               | -             | +              |
| Oxidasa                          | 5,0-24        | 5,0-20       | 0,5-24       | 2,0-24       | 5,0-24       | 2,5-28       | 0-20          | 0,5 - 25     | 1,0 - 20     | 0,5 - 15     | 1,0 - 25     | 0,5 - 27        | 3,5 - 20     | 2,0- 30         | 3,0 -25       | 0,5 - 15       |
| Rango de tolerancia a la sal (%) | 3-10          | 5-10         | 3-10         | 5-15         | 5,0-15       | 5-10         | 3- 8.         | 8            | 9            | 3- 6         | 10           | 0,5 - 12        | ND           | ND              | ND            | 3- 6           |
| Óptimo de Sal                    | 5-9           | 5-9          | 5-9          | 5-9          | 5-9          | 5-9          | 5-10          | 5-10         | 5-10         | 7- 11        | 6- 9         | 5- 10           | 5-9          | 5- 10           | 5-9           | 5- 11          |
| Rango de pH                      | 20-45         | 20-45        | 20-45        | 20-45        | 20-45        | 20-37        | 4- 45         | 4- 45        | 10- 45       | 10- 45       | 15- 37       | 4- 37           | 15- 45       | 5- 45           | 15- 45        | 7- 35          |
| Rango de Temperatura (°C)        |               |              |              |              |              |              |               |              |              |              |              |                 |              |                 |               |                |
| Hidrólisis de                    |               |              |              |              |              |              |               |              |              |              |              |                 |              |                 |               |                |
| Gelatina                         | -             | -            | -            | -            | -            | +            | +             | -            | -            | -            | -            | +               | -            | -               | -             | -              |
| Almidón                          | -             | -            | -            | -            | -            | -            | -             | -            | -            | -            | -            | -               | -            | -               | -             | -              |
| Tween 20                         | -             | -            | -            | -            | -            | -            | -             | +            | +            | +            | +            | -               | -            | -               | -             | +              |
| Producción de: H2S               | -             | -            | -            | -            | -            | -            | +             | +            | +            | +            | +            | -               | -            | -               | -             | ND             |
| Crecimiento en Mc Conkey         | -             | -            | -            | -            | -            | -            | +             | +            | +            | +            | +            | +               | ND           | ND              | ND            | ND             |
| utilización de CH                |               |              |              |              |              |              |               |              |              |              |              |                 |              |                 |               |                |
| Glucosa                          | +             | +            | +            | +            | +            | +            | +             | +            | +            | -            | +            | +               | ND           | +               | +             | -              |
| Fructosa                         | -             | -            | -            | -            | -            | -            | +             | +            | +            | +            | +            | +               | ND           | +               | +             | ND             |
| Galactosa                        | +             | -            | -            | -            | +            | +            | +             | +            | +            | -            | +            | +               | ND           | ND              | ND            | -              |
| Maltosa                          | +             | +            | +            | +            | +            | -            | -             | +            | +            | +            | +            | +               | ND           | +               | -             | -              |
| Manosa                           | +             | -            | +            | -            | +            | +            | +             | +            | +            | +            | +            | +               | +            | +               | +             | -              |

1, ATA3; 2, ATA4; 3,ATA9; 4,ATA11; 5, ATA17; 6, ATA20; 7, *H. elongata*; 8, *H. eurihalina*; 9, *H. maura*; 10, *H. desiderata*; 11, *H. variabilis*; 12, *H. marsiflavae*; 13, *H. Halocynthiae*; 14, *C. israelensis*; 15, *C. marismontui*; 16, *C. canadensis*.  
 +, Positivo, -, Negativo; ND, no determinado

## VI.-CONCLUSIONES

1. De las muestras de sal provenientes de las minas salinas de Atacocha, ubicada en el departamento de Ayacucho se aislaron un total de 40 bacterias halófilas que crecieron en el medio agua de sales a diferentes concentraciones de NaCl.
2. Se seleccionaron 20 aislados con características culturales diferentes que crecieron en el medio MY suplementado con agua de sales al 7.5%. con la característica fenotípica de producir Exopolisacáridos
3. Fenotípicamente los 20 aislados productores de EPS, presentaron algunas características similares a las del género *Halomonas* como son las de ser: bacilos Gran negativos, halófilos moderados, con crecimiento a temperaturas de 15 a 37 °C y pH de 5 a 9 y características bioquímicas y nutricionales que difieren de las características descritas para éste género.
4. Mediante el ARDRA se obtuvieron 18 perfiles genéticos diferentes, agrupados en las bacterias halófilas moderadas productoras de EPS, agrupadas en 3 grupos heterogéneos con 20 cepas diferentes según el análisis UPGMA.
5. El análisis filogenético basado en las secuencias de los genes ribosómicos 16S de ATA3, ATA4, ATA11, ATA9, ATA17 y ATA20 mostró que los aislados pertenecen a los géneros *Halomonas* y *Chromohalobacter*, ubicados dentro de la Familia *Halomonadaceae* en las  $\gamma$ - proteobacteria.
6. El análisis de las secuencias de los genes ribosómicos 16S, las características fenotípicas y el ARDRA, permitió identificar a las seis bacterias halófilas moderadas productoras de EPS de la siguiente manera: ATA11 y ATA4 como cepas diferentes de las especies de

*Halomonas Eurihalina* y *Halomonas marsiflavae* respectivamente; ATA9 y ATA17, se proponen como nuevas especies productoras de EPS pertenecientes al género *Halomonas*, así como ATA3 y ATA20, del género *Chromohalobacter*.

## VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Oren, A. 2002. MiniReview Molecular ecology of extremely halophilic Archeae and Bacteria, FEMS Microbiol Ecol. 39: 1- 7.
2. Rodriguez-Valera, F. 1988. Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments, 3–30. *In* Rodri'guez-Valera, F (ed.), Halophilic bacteria, vol. 1.
3. Galinski, E. A. 1995. Osmoadaptation in Bacteria. *Adv. Microbial Physiol*, 37: 273–328.
4. Marshall, B, J., Ohye, D,F, Christian, B.1970. Tolerance of Bacteria to High Concentrations of NaCl and Glycerol in the Growth Medium Common wealth Scientific and Industrial Research Organization, *Applied Microbiology*, 363-364 .
5. Vreeland, R. H. 1993. Taxonomy of halophilic bacteria, 105–134. *In* R. H. Vreeland and L. I. Hochstein (ed.), *The biology of halophilic bacteria*, Press, Inc., Boca Raton, Fla.
6. Kushner, D.J., Kamekura, M. 1988. Physiology of halophilic eubacteria. *In*: Rodriguez-Valera, F. (Eds.), *Halophilic Bacteria*, 1: 109– 140.
7. Acinas, A. J. Martínez-Murcia, Rodríguez – Valera, F. 1996. Description of Prokaryotic biodiversity along the salinity gradient of a multipond solar saltern by direct PCR amplification of 16S rDNA. *S. Benlloch, S. G. Hydrobiology*, 329: 19-31.
8. Ventosa, A., Nieto, J. 1995. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World. J. Microbiol Biotechnol*, 11: 85 – 94.
9. LeFevre, E., Round, A. 1919. Preliminary report upon some halophilic bacteria. *J. Bacteriol.* 4:177–182.
10. Hof, T. Investigations concerning bacterial life in strong brines. *Rev. Trav. Bot. Neerl.* (1919) 32:92 – 171.

11. Skerman, V. B. D., V. McGowan, P. H. A. 1980. Approved list of bacterial names. *Int. J. Systematic Bacteriol.* 30:225–42.
12. Smith, F. B. 1938. An investigation of a taint in rib bones of bacon. The determination of halophilic vibrios (n. spp.). *Proc. R. Soc. Queens.* 49:29–52.
13. Onishi, H., Kamekura, M. 1972, *Micrococcus halobius* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 22:233–236.
14. Kocur, M. 1984. Genus *Paracoccus* Davis. 384a, p. 399–402. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
15. Elazari-Volcani B. 1943. Bacteria in the bottom sediments of the Dead Sea. *Nature*, 152:274–275.
16. Novitsky and Kushner. 1984. *Marinococcus halophilus* comb. nov. *J. Gene Apply. Microbial.* 30: 449-459.
17. Rodriguez-Valera, F. 1986. The ecology and taxonomy of aerobic chemoorganotrophic halophilic Eubacteria. *FEMS Microbiology Review*, 39:17–22.
18. Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G., Imhoff, J. F. 1985. Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. *Microbiology Ecology*, 11:107–115.
19. Franzmann, P. D., Wehmeyer, U., Stackebrandt, E. 1988. *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class *Proteobacteria* to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. *Syst. Applied Microbiology*, 11: 16 – 19.
20. Dobson, S. J., McMeekin, T. A., Franzmann, P. D. 1993. Phylogenetic relationships between some members of the genera *Deleya*, *Halomonas*, and *Halovibrio*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43: 665 – 673.
21. Fendrich, C. 1988. *Halovibrio variabilis* gen. nov. sp. nov., *Pseudomonas halophila* sp. nov. and a new halophilic aerobic coccoid eubacterium from Great Salt Lake, Utah. *Systematic Applied Microbiology*, 11:36–43.
22. Franzmann, P. D., Burton, H. R., McMeekin, T. A. 1987. *Halomonas subglaciescola*, a new species of halotolerant bacteria isolated from Antarctica. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 27-34.

23. Onishi, H., Fuchi, H., Konomi, K., Hidaka, O., and M. Kamekura. 1980. Isolation and distribution of a variety of halophilic bacteria and their classification by salt-response. *Agriculture Biological Chemistry*, 44:1253–1258.
24. Ventosa, A., Quesada, E., Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A. 1982. Numerical taxonomy of moderately halophilic gram-negative rods. *J Gen Microbiol*, 128: 1959-1968.
25. Ventosa, A. 1994. Taxonomy and phylogeny of moderately halophilic bacteria, *Bacterial diversity and systematics*, 231–242.
26. Dobson, S. J., Franzmann, P. D. 1996. Unification of the genera *Deleya* (Baumann et al. 1983), *Halomonas* (Vreeland et al. 1980), and *Halovibrium* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 550–558.
27. Benlloch S, Lopez-Lopez A, Casamayor EO, Ovreas L, Goddard V, Daae FL, Smerdon G, Massana R, Joint I, Thingstad F, Pedros-Alio C, Rodríguez Valera, 2002, Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *F. Environ. Microbiol.* 4: 349-360.
28. Ventosa, A., Nieto, J.J., Oren, A. 1998. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria, *Microbiol. Molec. Biol. Reviews* 504–544.
29. Margesin, R., Schnner, F., 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5: 73-83.
30. Quillaguamán, J., Delgado, O., Bo, M., Rajni H. 2006. Poly -hydroxybutyrate production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. *Enz. Microbiol Technol.* 38: 148–154.
31. Satomi, M., B. Kimura, M. Mizoi, T. Sato, Fujii, T. 1997. *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid liver sauce. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 832–836.
32. Yoon, J. H., Lee, K. C., Kho, Y. H., Kang, K. H., Kim C. J., and Park, Y. H. 2002. *Halomonas alimentaria* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 123-130.

33. Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Martin, E. L, Elliot, E. 1980. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:485–495.
34. Dobson, S. J., and P. D. Franzmann. Unification of the genera *Deleya* (Baumann et al. 1983), *Halomonas* (Vreeland et al. 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* (1996), 46: 550–558.
35. Franzmann, P. D., Tindall, B. J. 1990. A chemotaxonomic study of members of the family *Halomonadaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.* 13:142–147.
36. Dobson, S.J., McMeekin, T.A., Franzmann, P.D. 1993. Phylogenetic relationships between some members of the genera *Deleya*, *Halomonas*, and *Halovibrio* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (4), 665–673.
37. Hebert, A. M., and R. H. Vreeland. 1987. Phenotypic comparison of halotolerant bacteria: *Halomonas halodurans* sp. nov., nom. rev., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:347–350.
38. Huval, J. H., R. Latta, R. Wallace, D. J. Kushner, and R. H. Vreeland. 1995. Description of two new species of *Halomonas*: *Halomonas israelensis* sp. nov. and *Halomonas canadensis* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 41:1124–1131.
39. Arahall D. R., Karl W. L., Ventosa, A. 2002. Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rDNA sequence analyses, *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 52: 241–249.
40. Ventosa, A., M. C. Gutierrez, M. T. Garcia, and F. Ruiz-Berraquero. 1989. Classification of “*Chromobacterium marismortui*” in a new genus, *Chromohalobacter* gen. nov., as *Chromohalobacter marismortui* comb. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39:382–386.
41. Arahall, D. R., García, M. T., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Ventosa, A. 2001. Transfer of *Halomonas canadensis* and *Halomonas israelensis* to the genus *Chromohalobacter* as *Chromohalobacter canadensis* comb. nov. and *Chromohalobacter israelensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1443–1448.
42. Arahall D.r., García M.T., Yargas C., Cánovas D., Nieto J.J. and Ventosa A. 2001. *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1457–1462.

43. Quilligamán J., Delgado O., Mattiasson B., Harri-Kaul, R., 2004. *Chromohalobacter sarecensis* sp. nov., a psychrotolerant moderate halophile isolated from the saline Andean region of Bolivia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1921-1926.
44. Prado B., Lizama C., Aguilera M., Ramos-Cormenza A., Fuentes S., Campos V. and Monteoliva-Sánchez M. 2006. *Chromohalobacter nigrandesensis* sp. nov., a moderately halophilic, Gram-negative bacterium isolated from Lake Tebenquiche on the Atacama Saltern, Chile. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 647-651.
45. Gamar L., Blondeau K. and Simonet J. 1997. "Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83". *J. App. Microbiol.* 83: 281-287.
46. Hettwer U., Gross M. and Rudolph K., 1995. Purification and Characterization of an Extracellular Levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*". *J. Bacteriol.* 177, 10: 2834-2839.
47. Kachlany S.C., Levery S.B. and Kim J.S. 2001. Structure and Carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7" *Environ. Microbiol.* 3 (2) : 774-78.
48. Kojic M., Vujcic M. and Banina A. 1992. Analysis of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from Cheese". *App. Environ. Microbiol.* 58 (12): 4086 – 4088.
49. Sutherland I.W. 1992. *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*. London, U.K. Cambridge Univerty Press. Roller y Dea.
50. Sutherland IW. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *T. Biotechnol.* 16: 41 – 46.
51. Page G.W. 1987. Microbial Gums" *B. Biotechnol.* 449- 453.
52. Schwartz, R.D., Bodie, E.A. 1985. Production of high-viscosity whey broths by a lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* strains. *App. Microbiol. Biotechnol.* 50 (6), 1483–1485.
53. Becker, A., Katzen, F., Piihler, A. and Ielpi, P. 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical, genetic perspective. *App. Microbiol. Biotechnol.* 50, 145–152.
54. Phillips G.O., Wedlock D.J., y Williams P.A. 1989. *Gums and Stabilisers for the Food Industry*, IRL Press. Oxford Univ. Press.



55. Cerning J., Bouillane C. and Desmazeaud M. 1986. Isolation and Characterization of Exocellular Polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*". *Biotechnol Letters*, 8, (9): 625-628.
56. Mozzi F., De Glori G. and Oliver G. 1996. Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* under controlled pH". *Biotechnol. Letters*, 18 (4): 435- 439.
57. Belder, A.N.1993. Dextran Industrial gums: polisacharides and their derivatives, Third edition. Academic Press, London, 417-499.
58. Sherwood, R.J., Baird, J.K., Atkinson, A., Wiblin, C.N., Rutter, D.A. and Ellwood, D.C. 1977. Enhanced plasma persistence of therapeutic enzyme by coupling to soluble dextran. *Bioch. J.* 164, 461.
59. Balazs, E.A., Denlinger, J.L.1989. Clinical uses of hyalorunan.in: Evered, D and Whelam,J. (Eds), *The biology of hyalorunan*. Ciba. Found Symposium. 143, John Wiley and Sons, New York, 265 – 275.
60. Ghosh, W.A., Bupp and Debirk, L.1990. Removal of heavy metal by biopolymers. *Proc. Conf. Hazard Waste Res*, 1: 449 – 476.
61. Quesada, E., V. Bejar, and C. Calvo. 1993. Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia*, 49:1037–1041.
62. Calvo, C., Ferrer, M. R., Martí'nez-Checa, F., Béjar, V., Quesada, E.1995. Some rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Volcaniella eurihalina* F2-7. *Appl Biochem Biotechnol*, 55: 45–54.
63. Béjar V, Llamas I, Calvo C, Quesada E. 1998. Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *J. Biotechnol.* 61:135–141.
64. Calvo, C., Martínez-Checa, F., Mota, A., Béjar, V., Quesada, E. 1998. Effect of cations, pH and sulfate content on the viscosity and emulsifying activity of the *Halomonas eurihalina* exopolysaccharide. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 20: 205–209.
65. Martínez-Checa F, Toledo FL, Vilchez R, Quesada E, Calvo C. 2002. Yield roduction, chemical composition and functionalproperties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihalina* strain H-28 in media containing various hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:358 – 363.

66. Perez M.E ; M.J.Montes, V.Béjar, E. Quesada, Ruiz, C. 1997. Efecto del polisacárido V 2-7 de *Halomonas eurihalina* cepa F2-7 sobre linfocitos humanos, abstr.222. in abstracts del XVI Congreso de la sociedad Española de Microbiología.
67. Arias, S., Del Moral, A., Ferrer, M. R., Quesada, E., Béjar, V. 2003. Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles*, 7: 319–326.
68. Bouchotroch, S., Quesada, E., Del Moral, A., Llamas, I., Béjar, V.2001. *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int. J. Syst Evol Microbiol.* 51, 1625–1632.
69. Rodriuez-Valera, F., Acinas, S.G. and Anton, J. 2002. Contribution of molecular techniques to the study of microbial diversity in hypersaline environments, In: *Microbiology and Biogeochemistry of A. Oren, F. Microbiol. Ecol.* (1999), 39: 1-7.
70. D'Auria G., Pushker R. Rodríguez-Valera F. 2006. Analyzing ribosomal Intergenic Transcribed Spacer configuration and taxonomic relationships. *Bioinformatics*, 22(5):527-531.
71. Moreira D, Rodriguez-Valera F, Lopez-Garcia P. 2006. Metagenomic analysis of mesopelagic Antarctic plankton reveals a novel deltaproteobacterial group *Microbiology* , 152 (2): 505 - 517.
72. Woese CR, Stackebrandt E, Macke TJ, Fox GE. 1985. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst. Appl. Microbiol.* 6:143-5 1.
73. Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. Ramos-Cormenzana, A. 1981. Characteristics of the heterotropic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microbiol. Ecol.* 7: 235–243.
74. Mata, J. A., Martínez-Cánovas, M. J., Quesada, E., Béjar, V. A. 2002. Detailed phenotypic characterization of the type strains of *Halomonas* species. *Syst. Appl. Microbiol.* 25: 360–375.
75. Zavaleta, A.I., Martinez - Murcia, J.A., Rodríguez - Valera, F. 1996. 16S-23S rDNA Intergenic Sequences Indicate that *Leuconostoc oenos* is phylogenetically homogeneous. *Microbiol.* 142: 2105 – 2114.
76. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, K., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignments aided by quality análisis tools. *Nucleic Acids Res*, 25: 4876 – 4882.

77. Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec. Biol Evolut.* 4: 406 - 425.
78. Kluge y Farris, 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.* 18:1-32.
79. Jukes & Cantor. 1969 Evolution of protein molecules. In Munro Mammalian Protein Metabolism. 21- 132.
80. Quesada, E., A. Ventosa, F. Rodriguez-Valera, L. Megias, A., Ramos- CORMENZANA. 1983. Numerical taxonomy of moderately halophilic gramnegative bacteria from hypersaline soils. *J. Gen. Microbiol.* 129:2649–2657.
81. Fernandez-Jerí Y, Maturrano L, Zavaleta A. I. 2005. Genetic Diversity in moderately Halophilic Exopolysaccharides - Producing Eubacteria Isolated from Hypersaline Environments in the Peruvian Andes, 105<sup>th</sup> General Meeting American Society for Microbiology, Georgia-USA.
82. Fernández-Jerí Y., Maturrano L., Negron L., Izaguirre V., Zavaleta A. I. 2004. Potencial Biotecnológico de Eubacterias Halófilas aisladas de ambientes salinos del Perú. Libro de Resúmenes de la VIII Jornada de Investigación en ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Lima – Perú.
83. Quesada, E., Bejar, V., Valderrama, M. J., Ventosa, A., Ramos- CORMENZANA. A. 1985. Isolation and characterization of moderately halophilic nonmotile rods from different saline habitats. *Microbiol SEM.* 1:89–96.
84. Martinez-canovas, M. J., Quesada, E., Martinez-Checa, F., Bejar, V. 2004. A taxonomic study to establish the relationship between exopolysaccharide-producing bacterial strains living in diverse hypersaline habitats. *C. Microbiol.* 48: 348-353.
85. Stackebrandt, E. Goebel, B. M. 1994. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
86. Quesada, E., Valderrama, M. J., Bejar, V., Ventosa, A., Gutierrez, M. C., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-CORMENZANA, A. 1990. *Volcaniella eurihalina* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic nonmotile gram-negative rod. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40:261–267.
87. Martínez-Cánovas, M. J., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Quesada, E. 2004. *Halomonas anticariensis* sp. nov., from Fuente de Piedra, a saline-wetland wildfowl reserve in Málaga, southern Spain, *Int. J. Syst Evol Microbiol.* 54, 1329–1332

88. Yoon, J.H., Choi, S. H., Lee, K.C., Kho, Y. H., Kang, K. H., Park, Y.H. 2001. *Halomonas marisflavae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the Yellow Sea in Korea. Int. J. Syst Evol Microbiol. 51: 1171 - 1177.

## ANEXO N° 01.

Figura. 1. Ubicación Topográfica de las Minas salinas de Atacocha - Ayacucho



## ANEXO N° 02.

### Minas Salinas de Atacocha en el Departamento de Ayacucho



Figura N° 2.1 Minas salinas de Atacocha - Ayacucho



Figura N° 2.2. Muestras de Sales sólidas

### ANEXO N° 3



**Figura. N°3.-Muestras de sal Sólida provenientes de las minas de sal de Atacocha-Ayacucho**

## ANEXO N° 4

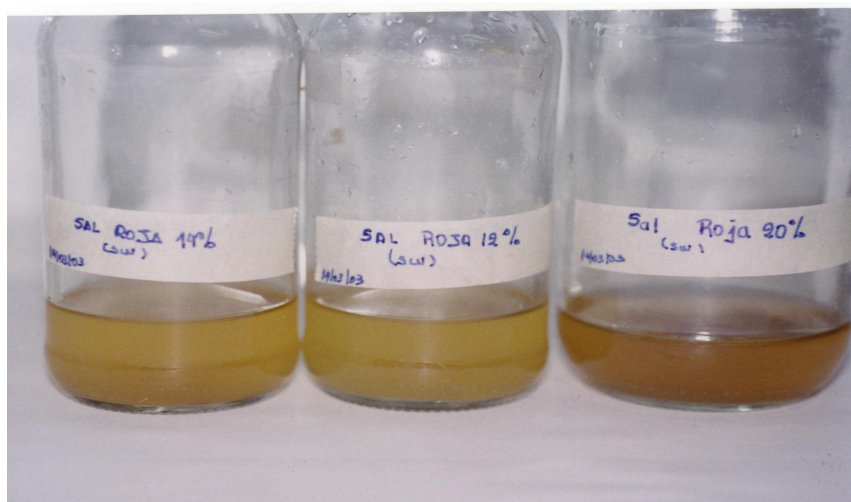


Figura. N°4. Pre- enriquecimiento de sales en caldo SW a diferentes concentraciones de NaCl.



## ANEXO N° 5.

### Medio agua de sales (SW).Solución Stock 20% , Rodríguez Valera ,1981

|                                       |          |    |
|---------------------------------------|----------|----|
| NaCl                                  | 81.000   | g  |
| MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O | 7.000    | g  |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O  | 9.600    | g  |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O  | 0.360    | g  |
| KCl                                   | 2.000    | g  |
| NaHCO <sub>3</sub>                    | 0.060    | g  |
| NaBr                                  | 0.026    | g  |
| Extracto de levadura (Difco)          | 5.000    | g  |
| Agua destilada                        | 1000.000 | ml |

## ANEXO N° 6.

### Medio 593: Médio MH al 10 %

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ

|                                      |          |    |
|--------------------------------------|----------|----|
| NaCl                                 | 81.000   | g  |
| MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O | 7.000    | g  |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 9.600    | g  |
| CaCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0.360    | g  |
| KCl                                  | 2.000    | g  |
| NaHCO <sub>3</sub>                   | 0.060    | g  |
| NaBr                                 | 0.026    | g  |
| proteasa peptona N°. 3 (Difco)       | 5.000    | g  |
| Extracto de levadura (Difco)         | 10.000   | g  |
| Glucosa                              | 1.000    | g  |
| Agua destilada                       | 1000.000 | ml |

pH Final 7.5

agregar NaHCO<sub>3</sub> de una solución stock esterilizada después que el medio este frío, para preparar medio sólido agregar agarosa a concentración final de de 15.0 g/l

## ANEXO N° 7

### Medio 183. MY-Halomonas. (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT)

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| NaCl                                 | 51.30 g   |
| MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O | 9.0 g     |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 13.0 g    |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,2 g     |
| KCl                                  | 1,3 g     |
| NaCO <sub>3</sub> H 0,               | 05 g      |
| NaBr                                 | 0.15 g    |
| FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O | traza     |
| Glucosa                              | 10.0 g    |
| Extracto de levadura                 | 3.0 g     |
| Extracto de malta                    | 3.0 g     |
| Proteasa peptona N°3                 | 5.0 g     |
| Agar                                 | 1.5 g     |
| Agua destilada                       | 1000.0 ml |
| Ajustar el pH a 7.0                  |           |

## Anexo N° 8

Codificación por banda polimorfica del Analisis ARDRA- PCR según estados presencia (1) o ausencia (0)

|        | ATA-  |      |   | ATA4 | ATA5 | ATA6 | ATA7 | ATA8 | ATA9 | ATA10 | ATA11 | ATA12 | ATA13 | ATA14 | ATA15 | ATA16 | ATA17 | ATA18 | ATA19 | ATA20 |
|--------|-------|------|---|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|        | ATA 1 | ATA2 | 3 |      |      |      |      |      |      |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| HAE1   | 0     | 0    | 0 | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 1     | 1     | 1     | 0     | 1     | 1     | 0     | 1     | 1     | 0     | 0     |
| HAE2   | 0     | 0    | 1 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HAE3   | 0     | 1    | 0 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HAE4   | 0     | 1    | 1 | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| HAE5   | 0     | 1    | 1 | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 0     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| HAE6   | 0     | 0    | 0 | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HAE7   | 0     | 0    | 0 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 1     | 1     | 0     | 1     | 0     | 0     | 1     | 1     | 0     | 0     |
| HAE8   | 0     | 0    | 0 | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 1     | 1     |
| HAE9   | 0     | 0    | 0 | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HAE10  | 0     | 0    | 0 | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HAE11  | 0     | 1    | 1 | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| HAE12  | 0     | 0    | 0 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HAE13  | 0     | 1    | 0 | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1     | 1     | 1     | 0     | 1     | 0     | 0     | 1     | 1     | 0     | 0     |
| HAE14  | 0     | 0    | 1 | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 1     | 1     |
| HAE15  | 0     | 0    | 0 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HAE16  | 1     | 0    | 0 | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HAE17  | 1     | 0    | 0 | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HINF1  | 0     | 0    | 0 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HINF2  | 0     | 1    | 1 | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| HINF3  | 0     | 1    | 0 | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HINF4  | 1     | 0    | 1 | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| HINF5  | 0     | 1    | 1 | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| HINF6  | 0     | 0    | 0 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1     | 1     | 1     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HINF7  | 0     | 0    | 0 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HINF8  | 0     | 0    | 0 | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HINF9  | 1     | 0    | 0 | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HINF10 | 0     | 0    | 0 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HINF11 | 0     | 0    | 0 | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HINF12 | 0     | 0    | 0 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HINF13 | 0     | 0    | 1 | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| HINF14 | 0     | 0    | 0 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HINF15 | 0     | 0    | 0 | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HINF16 | 0     | 0    | 0 | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0     | 1     | 1     | 1     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HINF17 | 1     | 1    | 0 | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HINF18 | 1     | 1    | 0 | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| HINF19 | 1     | 0    | 0 | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |

|       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CFO1  | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| CFO2  | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CFO3  | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CFO4  | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| CFO5  | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CFO6  | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| CFO7  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CFO8  | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CFO9  | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CFO10 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| CFO11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CFO12 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CFO13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| CFO14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| CFO15 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CFO16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CFO17 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CFO18 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CFO19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| CFO20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CFO21 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| CFO22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CFO23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CFO24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CFO25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| CFO26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RSA1  | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RSA2  | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| RSA3  | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| RSA4  | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RSA5  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RSA6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RSA7  | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RSA8  | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| RSA9  | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RSA10 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RSA11 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RSA12 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RSA13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| RSA14 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RSA15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RSA16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RSA17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| RSA18 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RSA19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| RSA20 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

|       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| RSA21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RSA22 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RSA23 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

## Anexo N° 9

Miembros de la familia *Halomonadaceae*, descritas al 2002 (Arahal y col). Fuentes e información de las secuencias de ADNr. Los cultivos de colección son a breviados como: ACAM, Australian Collection of Antarctic Micro-organisms; ATCC, American Type Culture Collection; CCM, Czech Collection of Microorganisms; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; IAM, Institute of Applied Microbiology; NCIMB, National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria; UQM, University of Queensland Microbial Culture Collection.

| Species                             | Type strain designation(s)   | Original source                               | Sequence accession nos (bp)   |                 |
|-------------------------------------|--|---|---|-----------------|
|                                     |  |   | 16S rRNA  | 23S rRNA        |
| <i>Carnimonas nigrificans</i>       | CECT 4437 <sup>T</sup> ; CTCBS1 <sup>T</sup>                                   | Cured meat products                           | Y13299 (1519)   | —               |
| <i>Chromohalobacter canadensis</i>  | ATCC 43984 <sup>T</sup> ; NRCC 41227 <sup>T</sup> ;<br>DSM 6769 <sup>T</sup>   | Medium contaminant (Canada)                   | AJ295143 (1532)   | AJ306870 (2910) |
| <i>Chromohalobacter israelensis</i> | ATCC 43985 <sup>T</sup> ; Ba <sub>1</sub> <sup>T</sup> ; DSM 6768 <sup>T</sup> | Dead Sea                                      | AJ295144 (1532)   | AJ306871 (2909) |
| <i>Chromohalobacter marismortui</i> | ATCC 17056 <sup>T</sup> ; CCM 3518 <sup>T</sup> ;<br>DSM 6770 <sup>T</sup>     | Dead Sea                                      | X87219 (1423)   | AJ306872 (2998) |
| <i>Chromohalobacter salexigens</i>  | DSM 3043 <sup>T</sup> ; IH11 <sup>T</sup> ; CECT 5384 <sup>T</sup>             | Solar saltern (Bonaire, Netherlands Antilles) | AJ295146 (1531)   | AJ306873 (2908) |
| <i>Halomonas aquamarina</i>         | IAM 12550 <sup>T</sup> ; ATCC 14400 <sup>T</sup> ;<br>DSM 30161 <sup>T</sup>   | Marine water (Hawaii, USA)                    | M93352 (1466);<br>AJ306888 (1528)   | AJ306874 (2914) |
| <i>Halomonas campisalis</i>         | ATCC 700597 <sup>T</sup> ; 4A <sup>T</sup>                                     | Alkali lake sediment (Washington, USA)        | AF054286 (1400)   | —               |
| <i>Halomonas cupida</i>             | ATCC 27124 <sup>T</sup> ; 79 <sup>T</sup> ; DSM 4740 <sup>T</sup>              | Marine water (Hawaii, USA)                    | L42615 (1471)   | AJ306875 (2910) |
| <i>Halomonas desiderata</i>         | DSM 9502 <sup>T</sup> ; FB2 <sup>T</sup>                                       | Sewage treatment plant (Göttingen, Germany)   | X92417 (1495)   | AJ306876 (2910) |
| <i>Halomonas elongata</i>           | ATCC 33173 <sup>T</sup> ; IH9 <sup>T</sup> ; DSM 2581 <sup>T</sup>             | Solar saltern (Bonaire, Netherlands Antilles) | M93355 (1479);<br>X67023 (1470)   | AJ306877 (2910) |
| <i>Halomonas eurihalina</i>         | ATCC 49336 <sup>T</sup> ; F9-6 <sup>T</sup> ; DSM 5720 <sup>T</sup>            | Saline soil (Alicante, Spain)                 | L42620 (1490);<br>X87218 (1473)   | AJ306878 (2911) |
| <i>Halomonas halmophila</i>         | NCIMB 1971 <sup>T</sup> ; DSM 5349 <sup>T</sup> ;<br>ATCC 19717 <sup>T</sup>   | Dead Sea                                      | M59153 (1540);<br>AJ306889 (1530)   | AJ306879 (2920) |
| <i>Halomonas halodenitrificans</i>  | ATCC 13511 <sup>T</sup> ; CCM 286 <sup>T</sup> ;<br>DSM 735 <sup>T</sup>       | Meat-curing brines                            | L04942 (1531)   | —               |
| <i>Halomonas halodurans</i>         | ATCC 29686 <sup>T</sup> ; DSM 5160 <sup>T</sup>                                | Great Bay Estuary (New Hampshire, USA)        | L42619 (1474)   | —               |
| <i>Halomonas halophila</i>          | CCM 3662 <sup>T</sup> ; F5-7 <sup>T</sup> ; DSM 4770 <sup>T</sup>              | Saline soil (Alicante, Spain)                 | M93353 (1478)   | —               |
| <i>Halomonas magadiensis</i>        | NCIMB 13595 <sup>T</sup> ; 2IM1 <sup>T</sup>                                   | East African alkaline lakes sediments         | X92150 (1473)   | —               |
| <i>Halomonas marina</i>             | ATCC 25374 <sup>T</sup> ; 219 <sup>T</sup> ; DSM 4741 <sup>T</sup>             | Marine water (Hawaii, USA)                    | M93354 (1483);<br>AJ306890 (1536)   | AJ306880 (2910) |
| <i>Halomonas meridiana</i>          | ACAM 246 <sup>T</sup> ; UQM 3352 <sup>T</sup> ;<br>DSM 5425 <sup>T</sup>       | Hypersaline lakes (Antarctica)                | M93356 (1475);<br>AJ306891 (1528)   | AJ306881 (2914) |
| <i>Halomonas pacifica</i>           | ATCC 27122 <sup>T</sup> ; 62 <sup>T</sup> ; DSM 4742 <sup>T</sup>              | Marine water (Hawaii, USA)                    | L42616 (1480)   | AJ306882 (2910) |
| <i>Halomonas panellertensis</i>     | DSM 9661 <sup>T</sup> ; AAP <sup>T</sup>                                       | Hard sand (Panterellia, Italy)                | X93493 (1477)   | AJ306883 (2912) |
| <i>Halomonas salina</i>             | ATCC 49509 <sup>T</sup> ; F8-11 <sup>T</sup> ;<br>DSM 5928 <sup>T</sup>        | Saline soils (Alicante, Spain)                | L42617 (1443);<br>X87217 (1478);<br>AJ243447 (1493);<br>AJ243448 (1493);<br>AJ295145 (1532) | AJ306884 (2908) |





